



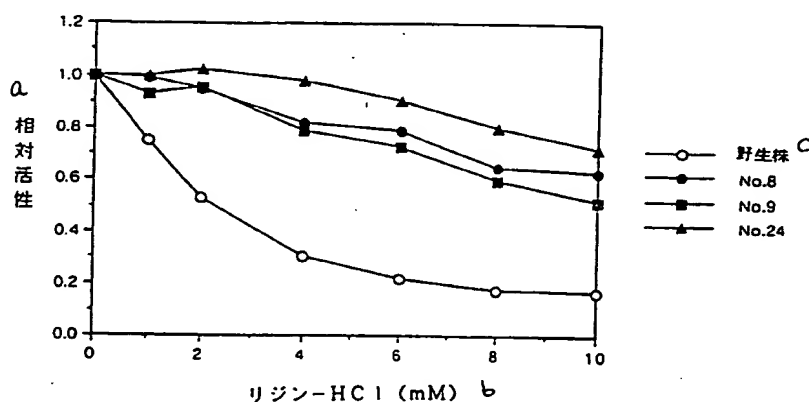
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 ⁶ C12N 15/54, 1/21, C12P 13/06		(11) 国際公開番号 WO 95/16042
A1		(43) 国際公開日 1995年6月15日 (15.06.95)
(21) 国際出願番号 PCT/J P94/01994 (22) 国際出願日 1994年11月28日 (28. 11. 94) (30) 優先権データ 特願平5/308397 1993年12月8日 (08. 12. 93) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社 (AJI-NOMOTO CO., INC.) [JP/JP] 〒104 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 児島宏之 (KOJIMA, Hiroyuki) [JP/JP] 尾川由理 (OGAWA, Yuri) [JP/JP] 川村和枝 (KAWAMURA, Kazue) [JP/JP] 佐野孝之輔 (SANO, Konosuke) [JP/JP] 〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 遠山 勉, 外 (TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, PL, RU, SK, US, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).		添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING L-LYSINE BY FERMENTATION

(54) 発明の名称 発酵法によるL-リジンの製造法

a: Relative activity
b: Lysine-HCl (mM)
c: wild strain



(57) Abstract

A process for producing L-Lysine by culturing in a suitable medium an *Escherichia* bacterium transformed by the introduction into its cells of a DNA coding for an *Escherichia*-derived dihydrodipicolinate synthase having such a variation as to be released from the feedback inhibition caused by L-lysine and a DNA coding for an *Escherichia*-derived aspartokinase III having such a variation as to be released from the feedback inhibition caused by L-lysine, preferably the above *Escherichia* bacterium which further has been enriched with a dihydrodipicolinate reductase gene and a coryneform-derived diaminopimelate dehydrogenase gene (or a succinyldiaminopimelate transaminase gene and a succinyldiaminopimelate deacylase gene), accumulating the produced L-lysine in the medium, and harvesting the accumulated L-lysine from the medium.

(57) 要約

Ｌ－リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するエシェリヒア属細菌由来のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAと、Ｌ－リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するエシェリヒア属細菌由来のアスパルトキナーゼIIIをコードするDNAとが細胞内に導入されることによって形質転換されたエシェリヒア属細菌、好ましくはさらにジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子、及びコリネ型細菌由来のジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（又はスクシニルジアミノピメリン酸トランスアミナーゼ遺伝子及びスクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼ遺伝子）が増強されたエシェリヒア属細菌を好適な培地中で培養し、該培養物中にＬ－リジンを生産蓄積させ、該培養物からＬ－リジンを採取する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MC	モナコ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドバ	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャド
BS	バハマ	HU	ハンガリー	MR	モロッコ	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MW	モザンビーク	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IT	イタリア	MX	メキシコ	TM	トルクメニスタン
CC	中央アフリカ共和国	JP	日本	NE	ニジェール	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KE	ケニア	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボアール	KG	キルギス	NZ	ニュージーランド	US	米国
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	KZ	大韓民国	PT	ポルトガル	VN	ベトナム
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ						
DK	デンマーク						

明細書

発酵法によるL-リジンの製造法

技術分野

本発明は微生物工業に関連したものであり、詳しくは、発酵法によるL-リジンの製造法、この製造法に用いるDNA及び微生物に関するものである。

背景技術

従来、発酵法によりL-リジンを製造する場合、生産性を向上させるために、自然界から分離した菌株または該菌株の人工変異株が用いられている。L-リジンを生産する人工変異株は数多く知られており、その多くはS-2-アミノエチルシステイン(AEC)耐性変異株であり、プレバクテリウム属、コリネバクテリウム属、バチルス属、またはエシェリヒア属に属している。また、組換えDNAを使用した形質転換体を用いる(米国特許第4278765号)等、アミノ酸の生産を増加させる種々の技術が開示されている。

例えば、エシェリヒア属においては、特開昭56-18596号公報、米国特許第4346, 170号およびApplied Microbiology and Biotechnology, 15, p227-231(1982)においてジヒドロジピコリン酸合成酵素(以下、「DDPS」と略すことがある)を増強した株を用いたL-リジンの製造法が示されている。しかし、ここで用いられたDDPSは野生型であり、L-リジンによるフィードバック阻害を受けるため、十分満足できるL-リジンの生産性が得られていなかった。尚、上記Applied Microbiology and Biotechnology, 15, p227-231(1982)に記載されているL-リジン生産量は、グルコース75 g/lからL-リジン塩酸塩3 g/lであり、消費係数(糖1 gに対し生産されるL-リジンのg数、又はその百分率)は0.04もしくは4%と計算される。

一方、L-リジンによるフィードバック阻害を受けない事が知られているコリネバクテリウム属細菌由来のDDPSを導入したエシェリヒア属細菌を用いたL-リジンの製造法が、大韓民国特許公告92-8382号に示されている(消費係数17

%)。しかし、コリネバクテリウム属細菌の生育上限温度はエシェリヒア属細菌の生育上限温度よりも10度程度低いために、コリネバクテリウム属細菌由来のDDPSをコードするDNAをエシェリヒア属細菌に導入してL-リジン生産に利用するためには、培養温度を下げた培養する必要があると考えられる。従って、エシェリヒア属細菌が有する、生育温度が高く生育速度及びL-リジン生産速度も速いという利点を発揮させる事が困難であると予想される。また、一般に異種生物由来の遺伝子を発現させる場合には、発現産物がプロテアーゼに分解されたり、不溶性の封入体を形成する事もあり、同種の遺伝子を発現させる場合よりも困難が予想される。さらに、コリネバクテリウム属細菌由来のDDPSをコードするDNAをエシェリヒア属細菌等に導入し、工業的にL-リジンを生産させる場合には、組換えDNAガイドラインに従って、同種遺伝子を導入した組換え体を使用するよりも厳しい規制が課せられる。

ところで、ジヒドロジピコリン酸合成酵素(DDPS)は、アスパルトセミアルデヒドとピルビン酸を脱水縮合させ、ジヒドロジピコリン酸を合成する酵素であり、この反応はアスパラギン酸系アミノ酸の生合成において、L-リジン生合成系への分岐の入口となっている。エシェリヒア属細菌においてはアスパルトキナーゼとともにL-リジン生合成の重要な調節部位を担っている事が知られている。

DDPSはE. coli (エシェリヒア・コリ:大腸菌)ではdapAという遺伝子にコードされている。このdapAはすでにクローニングされており、塩基配列も決定されている(Richaud, F. et al. J. Bacteriol., 297 (1986))。

一方、アスパルトキナーゼ(以下、「AK」と略すことがある)は、アスパラギン酸をβ-ホスホアスパラギン酸に変える反応を触媒する酵素であり、アスパラギン酸系のアミノ酸の生合成系の主な調節酵素となっている。E. coliのAKは3種あり(AKI, AKII, AKIII)、うち2つはホモセリンデヒドロゲナーゼ(以下、「HD」と略すことがある)との複合酵素である。複合酵素の内のひとつはthrA遺伝子にコードされるAKI-HDIであり、もう一方はmetLM遺伝子にコードされるAKII-HDIIである。AKIはスレオニンとイソロイシンによる協奏的抑制及びスレオニンによる阻害を受け、AKIIはメチオニンによる抑制

を受ける。

これらに対し、AKIIIのみは単機能酵素であり、lysCと名付けられた遺伝子の産物であって、L-リジンによる抑制及びフィードバック阻害を受けることが知られている。菌体内でのこれらの活性の割合は、AKI:AKII:AKIII=約5:1:4となっている。

上述したように、コリネバクテリウム属細菌由来のDDPSは、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないが、これをエシェリヒア属細菌に導入してL-リジン生産に利用するためには、培養温度の点で問題がある。L-リジンによるフィードバック阻害を受けないエシェリヒア属細菌由来のDDPSあるいはAKIIIの変異酵素を取得することができれば、エシェリヒア属細菌を用いて効率の良いL-リジンの発酵生産を行うことができることが期待されるが、DDPSの変異酵素を示した先行文献はなく、また、AKIIIの変異酵素についても報告はあるものの(Boy, E. et al., J. Bacteriol., 112. 84, (1972))、同変異酵素がL-リジンの生産性を改善できることを示唆した例は知られていない。

発明の開示

本発明は、上記観点からなされたものであり、L-リジンによるフィードバック阻害が十分に解除されたエシェリヒア属細菌由来のDDPSとAKIIIを取得し、従来よりもさらに改良された発酵法によるL-リジンの製造法を提供することを課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、L-リジンによるフィードバック阻害が十分に解除されたエシェリヒア属細菌由来のDDPSをコードするDNAを取得することに成功した。尚、L-リジンによるフィードバック阻害が十分に解除されたE. coli由来のDDPSをコードするDNAを本明細書において変異型dapAあるいはdapA*とよぶことがある。

本願発明者らはまた、L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼおよび変異型dapAを保持するエシェリヒア属細菌を創製した。尚、L-リジンによるフィードバック阻害が十分に解除されたE. coli由来のアスパルトキナーゼをコードするDNAを本明細書において変異型lysCあるいは

lys C*とよぶことがある。

さらに本願発明者らは、変異型dapA及び変異型lys Cを保持するエシェリヒア属細菌を創製した。そして同エシェリヒア属細菌を好適な培地で培養することにより、該培養物中にL-リジンを著量生産蓄積させ得ることを見出した。

また、本願発明者らは、変異型dapA及び変異型lys Cを保持するエシェリヒア属細菌のL-リジン生合成系の他の遺伝子を増強することにより、L-リジン生産能をさらに向上させることができることを見出した。

すなわち本願発明は、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するエシェリヒア属細菌由来のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAである。このL-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異としては、配列表の配列番号4に記載されるジヒドロジピコリン酸合成酵素のアミノ酸配列中、N-末端から81番目のアラニン残基をバリン残基に置換させる変異、118番目のヒスチジン残基をチロシン残基に置換させる変異、81番目のアラニン残基をバリン残基に置換させかつ118番目のヒスチジン残基をチロシン残基に置換させる変異よりなる群から選ばれる変異が挙げられる。

本願発明はまた、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するエシェリヒア属細菌由来のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAが細胞内に導入されて形質転換されたエシェリヒア属細菌である。L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異としては、配列表の配列番号4に記載されるジヒドロジピコリン酸合成酵素のアミノ酸配列中、N-末端から81番目のアラニン残基をバリン残基に置換させる変異、118番目のヒスチジン残基をチロシン残基に置換させる変異、81番目のアラニン残基をバリン残基に置換させかつ118番目のヒスチジン残基をチロシン残基に置換させる変異が挙げられる。

本願発明はさらに、L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼをさらに保持することを特徴とする前記エシェリヒア属細菌である。L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼをエシェリヒア属細菌に保持させる方法としては、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するエシェリヒア属細菌由来のアスパルトキナーゼIIIをコ

ードするDNAを細胞内に導入する方法が挙げられる。

Ｌーリジンによるフィードバック阻害が解除されるアスパルトキナーゼIIIの変異としては、配列表の配列番号 8 に記載されるアスパルトキナーゼIIIのアミノ酸配列中、N-末端から 3 2 3 番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、3 2 3 番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させかつ 4 0 8 番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、3 4 番目のアルギニン残基をシステイン残基に置換させかつ 3 2 3 番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、3 2 5 番目のロイシン残基をフェニルアラニン残基に置換させる変異、3 1 8 番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させる変異、3 1 8 番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ 3 4 9 番目のバリン残基をメチオニン残基に置換させる変異、3 4 5 番目のセリン残基をロイシン残基に置換させる変異、3 4 7 番目のバリン残基をメチオニン残基に置換させる変異、3 5 2 番目のスレオニン残基をイソロイシン残基に置換させる変異、3 5 2 番目のスレオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ 3 6 9 番目のセリン残基をフェニルアラニン残基に置換させる変異、1 6 4 番目のグルタミン酸残基をリジン残基に置換させる変異、4 1 7 番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ 4 1 9 番目のシステイン残基をチロシン残基に置換させる変異が挙げられる。

尚、Ｌーリジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するエシェリヒア属細菌由来のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNA及びＬーリジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するアスパルトキナーゼIIIをコードするDNAは、各々エシェリヒア属細菌の染色体に保持されていても、細胞内で同一または別々のプラスミド上に保持されていてもよい。さらに、各々のDNAの一方が染色体に保持され、もう一方のDNAがプラスミド上に保持されていてもよい。

本発明はまた、さらにジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子が増強された前記エシェリヒア属細菌である。ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子の増強は、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子がエシェリヒア属細菌細胞内で自律複製可能なベクターに連結されてなる組換えDNAで形質転換することによ

り行うことができる。

本発明はさらに、増強されたブレビバクテリウム ラクトファーメンタム等のコリネ型細菌由来のジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が導入された前記エシェリヒア属細菌である。増強されたコリネ型細菌由来のジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のエシェリヒア属細菌への導入は、該遺伝子がエシェリヒア属細菌細胞内で自律複製可能なベクターに連結されてなる組換えDNAで形質転換することにより行うことができる。コリネ型細菌としては、コリネバクテリウム属細菌またはブレビバクテリウム属細菌であって、グルタミン酸生産能を有する野生株及び他のアミノ酸生産能を有するこれらの変異株が挙げられる。より具体的には、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの他に、ブレビバクテリウム・フラバム、ブレビバクテリウム・ディバリカタム、コリネバクテリウム・グルタミカム、コリネバクテリウム・リリウム等が挙げられる。

本発明はまた、前記ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の代わりにスクシニルジアミノピメリン酸トランスアミナーゼ遺伝子及びスクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼ遺伝子が増強されたエシェリヒア属細菌である。これらの遺伝子の増強は、これらの遺伝子がエシェリヒア属細菌細胞内で自律複製可能な同一又は異なるベクターに連結されてなる単一の組換えDNA又は2つの組換えDNAで形質転換することにより行うことができる。

本発明はまた、上記のエシェリヒア属細菌のいずれかを好適な培地で培養し、該培養物中にL-リジンを生産蓄積せしめ、該培養物からL-リジンを採取することを特徴とするL-リジンの製造法を提供する。

尚、本明細書において、DDPS又はAKIIIをコードするDNA、あるいはこれらにプロモーターを含むDNAを、「DDPS遺伝子」又は「AKIII遺伝子」ということがある。また、L-リジンによるフィードバック阻害が解除された変異酵素を単に「変異型酵素」、これをコードするDNAあるいはこれにプロモーターを含むDNAを「変異型遺伝子」ということがある。さらに、「L-リジンによるフィードバック阻害が解除される」とは、実質的に阻害が解除されていればよいことを意味し、完全に解除されている必要はない。

以下、本発明について詳細に説明する。

< 1 > 本発明の変異型ジヒドロジピコリン酸合成酵素 (DDPS) をコードする DNA

本発明の変異型 DDPS をコードする DNA は、野生型 DDPS をコードする DNA において、コードされる DDPS の L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するものである。DDPS としては、エシェリヒア属細菌由来のもの、特に *E. coli* 由来の DDPS が挙げられる。また、DDPS の L-リジンによるフィードバック阻害を解除する変異としては、配列表の配列番号 4 に記載される DDPS のアミノ酸配列中、DDPS の N-末端から

- ① 81 番目のアラニン残基をバリン残基に置換させる変異、
 - ② 118 番目のヒスチジン残基をチロシン残基に置換させる変異、
 - ③ 81 番目のアラニン残基をバリン残基に置換させかつ 118 番目のヒスチジン残基をチロシン残基に置換させる変異、
- が挙げられる。

野生型 DDPS をコードする DNA としては、エシェリヒア属細菌由来の DDPS をコードするものであれば特に制限されないが、具体的には配列番号 4 に示すアミノ酸配列をコードする DNA が挙げられ、さらに具体的には配列番号 3 に示す塩基配列のうち、塩基番号 272 ~ 1147 で表される配列が挙げられる。これらの配列において、上記アミノ酸残基の置換を起こすような塩基配列の変異を有するものが、本発明の変異型 DDPS をコードする DNA である。尚、置換されたアミノ酸残基に対応するコドンは、そのアミノ酸残基をコードするものであれば種類は特に問わない。また、菌種や菌株の違いにより保持する DDPS の配列がわずかに相異することが予想されるが、このような酵素の活性に関与しない位置でのアミノ酸残基の置換、欠失あるいは挿入を有するものも本発明の変異型 DDPS 遺伝子に含まれる。

このような変異型遺伝子を取得する方法は以下の通りである。まず、野生型 DDPS 遺伝子又は他の変異を有する DDPS 遺伝子を含有する DNA をインビトロ変異処理し、変異処理後の DNA と宿主に適合するベクター DNA とを連結して組換え DNA を得る。組換え DNA を宿主微生物に導入して形質転換体を得、

同形質転換体のうちで変異型DDPSを発現するように至ったものを選択すれば、同形質転換体の変異型遺伝子を保持している。また、野生型DDPS遺伝子又は他の変異を有するDDPS遺伝子を含有するDNAを、宿主に適合するベクターDNAと連結して組換えDNAを得て、その後組換えDNAをインビトロ変異処理し、変異処理後の組換えDNAを宿主微生物に導入して形質転換体を得、同形質転換体のうちで変異型DDPSを発現するように至ったものを選択しても、同形質転換体は変異型遺伝子を保持している。

野生型酵素を生産する微生物を変異処理し、変異型酵素を生産する変異株を創成した後、該変異株から変異型遺伝子を取得してもよい。もしくは、野生型遺伝子が連結されている組換えDNAが導入されている形質転換体を変異処理し、変異型酵素を生産する変異株を創成した後、該変異株から組換えDNAを回収すれば、同DNA上に変異型遺伝子が創成される。

DNAをインビトロ変異処理するための薬剤としては、ヒドロキシルアミン等が挙げられる。ヒドロキシルアミンは、シトシンをN⁴-ヒドロキシシトシンに変えることによりシトシンからチミンへの変異を起こす化学変異処理剤である。また、微生物自体を変異処理する場合は、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくは亜硝酸等の通常人工突然変異に用いられている変異剤による処理を行う。

上記野生型DDPS遺伝子あるいは他の変異を有するDDPS遺伝子を含有するDNAの供与菌としては、エシェリヒア属に属する微生物であればいかなるものを用いてもかまわない。具体的にはナイトハルトらの著書(Neidhardt, F.C. et.al., *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1208, table 1)にあげられるものが利用できる。たとえば、*E. coli* JM109 株や、MC1061 株などがあげられる。DDPS遺伝子を含有するDNAの供与菌として野生株を用いた場合、野生型のDDPS遺伝子を含むDNAが取得できる。

(1) 野生型DDPS遺伝子の取得

以下に、DDPS遺伝子を含有するDNAの調製例について述べる。まず、野生型

のdapAをもつE. coli例えばMC1061株を培養して培養物を得る。上記微生物を培養するには、通常の固体培養法で培養しても良いが、集菌の際の効率を考慮すると液体培養法を採用して培養するのが好ましい。また、培地としては、例えば酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカーまたは大豆もしくは小麦の浸出液等の1種類以上の窒素源に、リン酸第1カリウム、リン酸第2カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化第2鉄、硫酸第2鉄または硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要に応じて糖質原料、ビタミン等を適宜添加した物が用いられる。なお、培地の初発pHは、6～8に調製するのが適当である。また培養は30～42℃、好ましくは37℃前後で4～24時間、通気攪拌深部培養、振盪培養または静置培養等により行う。

このようにして得られた培養物を、例えば3,000 r.p.m.で5分間遠心分離してE. coli MC1061株の菌体を得る。この菌体より、例えば斎藤、三浦の方法(Biochem. Biophys. Acta., 72, 619, (1963))、K. S. Kirbyの方法(Biochem. J., 64, 405, (1956))等の方法により染色体DNAを得ることができる。

こうして得られた染色体DNAからDDPS遺伝子を単離するために、染色体DNAライブラリーを作製する。まず、染色体DNAを適当な制限酵素で部分分解して種々の断片混合物を得る。切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。例えば、Sau3AIを、温度30℃以上、好ましくは37℃、酵素濃度1～10ユニット/mlで様々な時間(1分～2時間)染色体DNAに作用させてこれを消化する。

ついで、切断された染色体DNA断片を、エシェリヒア属細菌細胞内で自律複製可能なベクターDNAに連結し、組換えDNAを作製する。具体的には、染色体DNAの切断に用いた制限酵素Sau3AIと相補的な末端塩基配列を生じさせる制限酵素、例えばBamHIを、温度30℃以上、酵素濃度1～100ユニット/mlの条件下で1時間以上、好ましくは1～3時間、ベクターDNAに作用させてこれを完全消化し、切断開裂する。次いで、上記のようにして得た染色体DNA断片混合物と切断開裂されたベクターDNAを混合し、これにDNAリガーゼ、好ましくはT4DNAリガーゼを、温度4～16℃、酵素濃度1～100ユニット/mlの条件下で1時間以上、好ましくは6～24時間作用させて組換えDNAを得る。

得られた組換えDNAを用いて、エシェリヒア属の微生物、例えば大腸菌K-12株、好ましくはJE7627株 (ponB704, dacB12, pfv⁺, tonA2, dapA, lysA, str, malA38, metB1, ilvH611, leuA371, proA3, lac-3, tsx-76) のようなDDPS欠損変異株を形質転換して染色体DNAライブラリーを作製する。この形質転換は D. M. Morrisonの方法 (Methods in Enzymology 68, 326 (1979)) あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159(1970)) 等により行うことができる。なお、JE7627株は国立遺伝学研究所 (日本国静岡県三島市) より入手可能である。

得られた染色体DNAライブラリーの中から、DDPS活性が増大した株あるいはDDPS遺伝子欠損に起因する栄養要求性が相補された株よりDDPS遺伝子の組換えDNAをもつ菌株を得る。例えば、DDPS欠損変異株はジアミノピメリン酸要求性であるので、DDPS欠損変異株を宿主に用いた場合は、ジアミノピメリン酸を含有しない培地上で生育可能となった菌株を単離し、該菌株から組換えDNAを回収することにより、DDPS遺伝子を含有するDNA断片を得ることができる。

DDPS遺伝子を含有する組換えDNAをもつ候補株が、実際にDDPS遺伝子がクローニングされた組換えDNAを保持するかどうかを確認するには、候補株から細胞抽出液を調製し、それより粗酵素液を調製してDDPS活性が増大していることを確認することにより達成できる。DDPSの酵素活性測定法は、Yugariらの方法により行うことができる (Yugari, Y. and Gilvarg, C., J. Biol. Chem., 240, 4710(1962))。

そして、上記菌株より、DDPS遺伝子を含有するDNAがベクターDNAに挿入された組換えDNAを、例えば P. Guerry らの方法 (J. Bacteriol., 116, 1064, (1973))、D. B. Clewell の方法 (J. Bacteriol., 110, 667, (1972)) などにより単離することができる。

野生型DDPS遺伝子の取得は、染色体上にDDPS遺伝子を有する株から、斎藤、三浦の方法等により染色体DNAを調製し、ポリメラーゼチェーンリアクション法 (PCR: polymerase chain reaction; White, T. J. et al; Trends Genet., 5, 185 (1989)参照) により、DDPS遺伝子を増幅することによっても行

える。増幅反応に用いるDNAプライマーは、DDPS遺伝子の全領域あるいは一部領域を含有するDNA二重鎖の両3'末端に相補するものを用いる。DDPS遺伝子の一部領域だけを増幅した場合には、該DNA断片をプライマーとして全領域を含むDNA断片を染色体DNAライブラリーよりスクリーニングする必要がある。DDPS遺伝子の全領域を増幅した場合には、増幅されたDDPS遺伝子を含有するDNA断片を含むPCR反応液をアガロースゲル電気泳動に供した後、目的のDNA断片を抽出することによってDDPS遺伝子を含有するDNA断片を回収できる。

DNAプライマーとしては、例えば*E. coli*において既知となっている配列(Richaud, F. et al., *J. Bacteriol.*, 297(1986))を基にして適宜作成すればよいが、具体的には、DDPS遺伝子をコードする1150塩基からなる領域を増幅できるプライマーが好ましく、配列番号1及び2に示した2種のプライマーが適当である。プライマーDNAの合成は、ホスホアミダイト法(Tetrahedron Letters, 22, 1859(1981)参照)等の常法により、市販のDNA合成装置(例えば、Applied Biosystems社製DNA合成機 model 380B等)を用いて行うことができる。また、PCR反応は、市販のPCR反応装置(宝酒造(株)製DNAサーマルサイクラー PJ2000型等)を使用し、TaqDNAポリメラーゼ(宝酒造(株)より供給されている)を用い、供給者により指定された方法に従って行うことができる。

PCR法により増幅されたDDPS遺伝子は、エシェリヒア属細菌細胞内において自律複製可能なベクターDNAに接続し、エシェリヒア属細菌細胞に導入することによって、DDPS遺伝子への変異の導入などの操作がしやすくなる。用いられるベクターDNAと形質転換法、さらにDDPS遺伝子の存在の確認方法は上述した方法と同じである。

(2) DDPS遺伝子への変異の導入

上記のようにして得られたDDPS遺伝子に、アミノ酸残基の置換、挿入および欠失等の変異を実施する方法としては、リコンビナントPCR法(Higuchi, R., 61, in *PCR Technology* (Erich, H. A. Eds., Stockton press(1989)))、部位特異的変異法(Kramer, W. and Frits, H. J., *Meth. in Enzymol.*, 154, 350 (1987)); Kunk

el, T. A. et. al., Meth. in Enzymol., 154, 367(1987)) などがある。これらの方法を用いると、目的部位に目的の変異を起こすことができる。

また、目的遺伝子を化学合成する方法によれば、目的部位への変異、あるいはランダムな変異を導入することができる。

さらに、染色体もしくはプラスミド上のDDPS遺伝子を直接ヒドロキシルアミンで処理する方法 (Hashimoto, T. and Sekiguchi, M., J. Bacteriol., 159, 1039 (1984)) がある。また、DDPS遺伝子を保有するエシェリヒア属細菌を紫外線照射する方法またはN-メチル-N'-ニトロソグアニジンもしくは亜硝酸などの化学薬剤処理による方法を用いてもよい。これらの方法によれば、ランダムに変異を導入できる。

変異型遺伝子の選択方法としては、まずDDPS遺伝子を含有するDNA断片とベクターDNAからなる組換えDNAを、直接ヒドロキシルアミン等で変異処理し、これで例えば *E. coli* W3110 株を形質転換する。次にL-リジンのアナログである、S-2-アミノエチルシステイン (AEC) を含む最少培地、例えばM9に形質転換株を培養する。野生型のDDPS遺伝子を含有する組換えDNAを保持する株は、その組換えDNAにより発現されるDDPSがAECにより阻害されるために、L-リジン及びジアミノピメリン酸(DAP)の合成が出来なくなり生育が抑えられる。これに対し、L-リジンによる阻害の解除されたDDPS遺伝子を含有する組換えDNAを保持する株は、同組換えDNA中のDDPS遺伝子にコードされる変異酵素がAECによる阻害を受けないので、AECが添加された最少培地上での生育が可能になるはずである。この現象を利用し、生育が、L-リジンのアナログであるAECに耐性となっている株、すなわち阻害の解除された変異型DDPS遺伝子を含有する組換えDNAを保持する株を選択することができる。

こうして得られた該変異型遺伝子を、組換えDNAとして適当な宿主微生物に導入し、発現させることによりフィードバック阻害が解除されたDDPSを保有する微生物を取得できる。宿主としては、エシェリヒア属に属する微生物が好ましく、例えば大腸菌 (*E. coli*) が挙げられる。

また、組換えDNAから変異型DDPS遺伝子断片を取り出し、他のベクター

DNAに挿入したものを使用してもよい。本発明において用いることのできる
ことのできるベクターDNAとしては、プラスミドベクターDNAが好ましく、例
えばpUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、p
MW119、pMW118、pMW219、pMW218等が挙げられる。他にもファージDNAのベクタ
ーも利用できる。

さらに、変異型DDPS遺伝子の発現を効率的に実施するために、変異型DD
PSをコードするDNA配列の上流に、lac、trp、PL等の微生物内で働
く他のプロモーターを連結してもよく、DDPS遺伝子に含まれるプロモーター
をそのまま、あるいは増幅して用いてもよい。

また、上記のように、変異型遺伝子を自律複製可能なベクターDNAに挿入し
たものを宿主に導入し、プラスミドのように染色体外DNAとして宿主に保持さ
せてもよいが、変異型遺伝子を、トランスダクション、トランスポゾン (Berg, D.
E. and Berg, C. M., Bio/Technol., 1, 417(1983))、Muファージ (特開平2-10
9985) または相同性組換え (Experiments in Molecular Genetics, Cold Sp
ring Harbor Lab. (1972)) を用いた方法で宿主微生物の染色体に組み込んでよい。

< 2 > 本発明に用いる変異型アスパルトキナーゼIII (AKIII) をコードするD
NA

本発明に用いる変異型AKIIIをコードするDNAは、野生型AKIIIをコード
するDNAにおいて、コードされるAKIIIのL-リジンによるフィードバック阻
害が解除される変異を有するものである。また、AKIIIのL-リジンによるフィ
ードバック阻害を解除する変異としては、配列表の配列番号8に示すAKIIIのア
ミノ酸配列中、AKIIIのN-末端から

- (イ) 323番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、
- (ロ) 323番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させかつ408番目のグリ
シン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、
- (ハ) 34番目のアルギニン残基をシステイン残基に置換させかつ323番目のグリ
シン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、

- (ニ)325番目のロイシン残基をフェニルアラニン残基に置換させる変異、
 - (ホ)318番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させる変異、
 - (ハ)318番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ349番目のバリン残基をメチオニン残基に置換させる変異、
 - (ト)345番目のセリン残基をロイシン残基に置換させる変異、
 - (チ)347番目のバリン残基をメチオニン残基に置換させる変異、
 - (リ)352番目のスレオニン残基をイソロイシン残基に置換させる変異、
 - (ヌ)352番目のスレオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ369番目のセリン残基をフェニルアラニン残基に置換させる変異、
 - (ル)164番目のグルタミン酸残基をリジン残基に置換させる変異、
 - (ヲ)417番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ419番目のシステイン残基をチロシン残基に置換させる変異、
- が挙げられる。

野生型AKIIIをコードするDNAとしては、特に制限されないが、エシェリヒア属細菌、例えばE. coli由来のAKIIIをコードするDNAが挙げられ、具体的には配列番号8に示すアミノ酸配列をコードするDNA、さらには配列番号7に示す塩基配列のうち、塩基番号584～1930で表される配列が挙げられる。尚、E. coliのAKIIIは、lysC遺伝子にコードされている。

これらの配列において、上記アミノ酸残基の置換を起こすような塩基配列の変異を有するものが、本発明の変異型AKIIIをコードするDNAである。尚、置換されたアミノ酸残基に対応するコドンは、そのアミノ酸残基をコードするものであれば種類は特に問わない。また、菌種や菌株の違いにより保持する野生型AKIIIのアミノ酸配列がわずかに相異なるものがある。このような酵素の活性に関与しない位置でのアミノ酸残基の置換、欠失あるいは挿入を有するものも本発明の変異型AKIII遺伝子に含まれる。例えば、後記実施例2で得られた野生型lysC遺伝子の塩基配列（配列番号7）は、既に発表されている E. coli K-12 JC411株のlysCの配列（Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G. N., and Patte, J. C., J. Biol. Chem., 261, 1052(1986)）と6ヶ所相違しており、そのうち2ヶ所でコードされるアミノ酸残基が異なっている（JC411株のlysCは、配列番号8に示すlysCのアミノ酸配列中、

N-末端から58番目のグリシン残基がシステイン残基に、401番目のグリシン残基がアラニン残基に置き換わっている)。このE. coli K-12 JC411株のlysCと同一の配列を有するlysCであっても、上記(イ)~(フ)のいずれかの変異を導入すれば、L-リジンによるフィードバック阻害が解除された変異を有するlysCが得られることが予想される。

リジンによるフィードバック阻害が解除された変異型AKIIIをコードするDNAを取得する方法は以下の通りである。まず、野生型AKIII遺伝子又は他の変異を有するAKIII遺伝子を含有するDNAをインビトロ変異処理し、変異処理後のDNAと宿主に適合するベクターDNAとを連結して組換えDNAを得る。組換えDNAを宿主微生物に導入して形質転換体を得、同形質転換体のうちで変異型AKIIIを発現するに至ったものを選択すれば、同形質転換体の変異型遺伝子を保持している。また、野生型AKIII遺伝子又は他の変異を有するAKIII遺伝子を含有するDNAを、宿主に適合するベクターDNAと連結して組換えDNAを得て、その後組換えDNAをインビトロ変異処理し、変異処理後の組換えDNAを宿主微生物に導入して形質転換体を得、同形質転換体のうちで変異型AKIIIを発現するに至ったものを選択しても、同形質転換体は変異型遺伝子を保持している。

あるいは、野生型酵素を生産する微生物を変異処理し、変異型酵素を生産する変異株を創成した後、該変異株から変異型遺伝子を取得してもよい。DNAを直接変異処理するための薬剤としては、ヒドロキシルアミン等が挙げられる。ヒドロキシルアミンは、シトシンをN⁴-ヒドロキシシトシンに変えることによりシトシンからチミンへの変異を起こす化学変異処理剤である。また、微生物自体を変異処理する場合は、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 等の通常人工突然変異に用いられている変異剤による処理を行う。

上記野生型AKIII遺伝子あるいは他の変異を有するAKIII遺伝子を含有するDNAの供与菌としては、エシェリヒア属に属する微生物であればいかなるものを用いてもかまわない。具体的にはナイトハルトらの著書 (Neidhardt, F.C. et. al., *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1208, table 1) にあげられるものが利用できる。たとえ

ば、*E. coli* JM109株や、MC1061株などがあげられる。これらの株からAKIII遺伝子を取得するに際し、染色体DNAの調製、染色体DNAライブラリーの作製等は、上記のDDPS遺伝子の取得と同様に行えばよい。ライブラリー作製に用いる宿主としては、AKI、II、III全欠損株、例えば*E. coli* GT3株 (*E. coli* Genetic Stock Center (米国コネチカット州) 等から入手できる) 等を用いることが好ましい。

得られた染色体DNAライブラリーの内、AKIII活性が増大した株あるいは栄養要求性が相補された株としてAKIII遺伝子の組換えDNAをもつ菌株を得る。候補株から細胞抽出液を調製し、それより粗酵素液を調製してAKIII活性を確認する。AKIIIの酵素活性測定法は、スタットマンらの方法により行うことができる (Stadtman, E. R., Cohen, G. N., LeBras, G., and Robichon-Szulmajster, H., *J. Biol. Chem.*, 236, 2033(1961))。

例えば、AK完全欠損変異株を宿主に用いた場合は、L-リジン、L-スレオニン、L-メチニオンおよびジアミノピメリン酸を含有しない培地上で、またはホモセリンおよびジアミノピメリン酸を含有しない培地上で生育可能となった形質転換株を単離し、該菌株から組換えDNAを回収することにより、AKIII遺伝子を含有するDNA断片を得ることができる。

尚、PCR法により染色体DNAからAKIII遺伝子を増幅する場合には、PCR反応に用いるDNAプライマーとしては、例えば*E. coli*において既知となっている配列 (Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G. N., and Patte, J. C., *J. Biol. Chem.*, 261, 1052(1986)) を基にして適宜作成できるが、*lysC*遺伝子をコードする1347塩基からなる領域を増幅できるプライマーが適当であり、例えば配列番号5及び6に示す配列を有する2種のプライマーが適当である。

上記のようにして得られたAKIII遺伝子に、アミノ酸残基の置換、挿入および欠失等の変異を実施する方法としては、前記DDPS遺伝子の変異処理と同様に、リコンビナントPCR法、部位特異的変異法などがある。

また、目的遺伝子を化学合成する方法によれば、目的部位への変異、あるいはランダムな変異を導入することができる。

さらに、染色体もしくは染色体外の組換えDNA上のAKIII遺伝子DNAを直

接ヒドロキシルアミンで処理する方法 (Hashimoto, T. and Sekiguchi, M., J. Bacteriol., 159, 1039(1984)) がある。また、染色体もしくは染色体外の組換えDNA上にAKIII遺伝子を保持するエシェリヒア属細菌を紫外線照射する方法、またはN-メチル-N'-ニトロソグアニジンもしくは亜硝酸などの化学薬剤で処理する方法を用いてもよい。

変異型AKIII遺伝子の選択方法としては、まず変異処理したAKIII遺伝子を含有する組換えDNAをAK完全欠損株、例えば E. coli GT3株に形質転換する。次に著量のL-リジンを含む最少培地、例えばM9で形質転換株を培養する。野生型のAKIII遺伝子を含有する組換えDNAを保持する株は、唯一のAKがL-リジンにより阻害されるために、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-メチオニン、及びジアミノピメリン酸(DAP)の合成が出来なくなり生育が抑えられる。これに対しL-リジンによる阻害の解除された変異型AKIII遺伝子を含有する組換えDNA保持株は、著量のL-リジンが添加された最少培地上での生育が可能になるはずである。この現象を利用し、生育が、L-リジンあるいはL-リジンのアナログであるAECに耐性となっている株、すなわち阻害の解除された変異型AKIII遺伝子を含有する組換えDNA保持株を選択することができる。

こうして得られた該変異型遺伝子を、組換えDNAとして適当な微生物(宿主)に導入し、発現させることによりフィードバック阻害が解除されたAKIIIを保有する微生物を取得できる。宿主としては、エシェリヒア属に属する微生物が好ましく、例えば大腸菌(E. coli)が挙げられる。

また、組換えDNAから変異AKIII遺伝子断片を取り出し、他のベクターに挿入したものを使用してもよい。本発明において用いることのできることのできるベクターDNAとしては、プラスミドベクターDNAが好ましく、例えばpUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218等が挙げられる。他にもファージDNAのベクターも利用できる。

さらに、変異型AKIII遺伝子の発現を効率的に実施するために、変異型AKIIIをコードするDNAの上流に、lac、trp、PL等の微生物内で働く他のプロモーターを連結してもよく、AKIII遺伝子に含まれるプロモーターをそのま

ま、あるいは増幅して用いてもよい。

また、上記のように、変異型遺伝子を自律複製可能なベクターDNAに挿入したものを宿主に導入し、プラスミドのように染色体外DNAとして宿主に保持させてもよいが、変異型遺伝子を、トランスダクション、トランスポゾン (Berg, D. E. and Berg, C. M., Bio/Technol., 1, 417(1983))、Muファージ (特開平2-109985) または相同性組換え (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)) を用いた方法で宿主微生物の染色体に組み込んでもよい。

< 3 > 本発明によるL-リジンの製造

上記のようにして得られる変異型DDPS遺伝子を導入することによって形質転換され、さらにL-リジンによるフィードバック阻害が解除されたAKを保持するエシェリヒア属細菌を、好適な培地中で培養し、該培養物中にL-リジンを生産蓄積させ、該培養物からL-リジンを採取することにより、L-リジンを効率よく製造することができる。すなわち、変異型DDPSと変異型AKIIIをともにエシェリヒア属細菌に保持させることによって、L-リジンを効率よく製造させることができる。

L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたAKを保持するエシェリヒア属細菌としては、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するAKIIIをコードするDNAが染色体DNAに組み込まれて形質転換されたエシェリヒア属細菌、または該DNAとエシェリヒア属細菌細胞内で自律複製可能なベクターDNAとを連結してなる組換えDNAが細胞内に導入されることによって形質転換されたエシェリヒア属細菌が挙げられる。また、L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたAKは、L-リジンによるフィードバック阻害を受けない野生型AKであってもよく、このような野生型AK遺伝子を同様にしてエシェリヒア属細菌に導入したものでもよい。さらに、エシェリヒア属細菌細胞を変異処理することにより、変異型AKIIIを産生するようになったエシェリヒア属細菌変異株であってもよい。

一方、変異型DDPS遺伝子をエシェリヒア属細菌に導入することによって形

質転換するには、変異型DDPS遺伝子を染色体DNAに組み込んで形質転換してもよく、変異型DDPS遺伝子とエシェリヒア属細菌細胞内で自律複製可能なベクターDNAとを連結してなる組換えDNAを細胞内に導入することによって形質転換してもよい。

変異型DDPS遺伝子及び変異型AKIII遺伝子の両方をエシェリヒア属細菌に導入する場合には、両方の変異型遺伝子がエシェリヒア属細菌の染色体DNA上に組み込まれて保持されていても、細胞内で単一または別々のプラスミド上に染色体外DNAとして保持されていてもよい。別々のプラスミドを用いる場合には、各々が安定して細胞内に保持されるような安定分配機構を有するプラスミドを用いることが好ましい。さらに、各々の変異型遺伝子の一方が染色体DNA上に組み込まれて保持され、もう一方の変異型遺伝子が細胞内でプラスミド上に染色体外DNAとして保持されていてもよい。変異型DDPS遺伝子及び変異型AKIII遺伝子をエシェリヒア属細菌に導入するに際しては、両遺伝子の導入の順序は問わない。

変異型DDPS遺伝子及び変異型AKIII遺伝子を導入されたエシェリヒア属細菌のジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子を増強することにより、L-リジン生産性を一層向上させることができる。さらに、変異型AKIII遺伝子及び変異型DDPS遺伝子を保持し、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子が増強されたエシェリヒア属細菌に、コリネ型細菌由来のジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を導入することによって、より一層L-リジン生産性を向上させることができる。このジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子は増強されている必要がある。また、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を導入する代わりに、スクシニルジアミノピメリン酸トランスアミナーゼ遺伝子及びスクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼ遺伝子を増強することによっても、同程度にL-リジン生産性を向上することができる。

ここで、遺伝子の増強とは、その遺伝子の発現産物である酵素の細胞当たりの活性を増強することをいう。具体的には、例えば、該遺伝子の細胞内コピー数を高めること、発現効率のよいプロモーターを用いて遺伝子当たりの発現量を高めること、酵素活性を高める変異を該遺伝子に導入することなどが挙げられる。細

胞内の遺伝子のコピー数を高めるには、エシェリヒア属細菌細胞内で自律複製可能なベクターに該遺伝子を挿入し、このベクターでエシェリヒア属細菌を形質転換すればよい。このベクターはマルチコピー型のプラスミドであることが好ましい。また、Muファージ等を用いて染色体DNAに組み込んだDNAを増幅することによりコピー数を増加させてもよい。プラスミドを用いる際に、変異型DDP S遺伝子及び変異型AKIII遺伝子の導入にプラスミドを用いた場合には、これらのプラスミドが共に安定して細胞内に保持されるような安定分配機構を有するプラスミドを用いることが好ましい。尚、各遺伝子の導入の順序は問わない。

上記のようにしてL-リジン生合成系遺伝子を順次増強することによりL-リジン生産性を段階的に向上させることができるメカニズムを以下に説明する。複数反応からなる生合成系は、直列に連結された太さの異なる複数のパイプを流れる液体にたとえることができる。ここで、各々のパイプは個々の酵素に相当し、そのパイプの太さは酵素反応速度に相当する。パイプを流れる液体の量を増やすには、最も細いパイプを太くするのが効果的である。太いパイプをさらに太くしても、効果は期待できない。さらに流量を増やすには、2番目に細いパイプを太くすればよい。本発明者らはこのような観点から、L-リジン生合成系を強化することを試みた。そのために、後記実施例6に示すように、E. coliに、E. coli由来のL-リジン生合成系遺伝子を段階的に導入することによって、L-リジン生合成系の律速段階の順位を解明した。その際、生合成系の下流に位置するdapC（テトラヒドロジピコリン酸スクシニラーゼ遺伝子）、dapD（スクシニルジアミノピメリン酸トランスアミナーゼ遺伝子）、dapE（スクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼ遺伝子）及びdapF（ジアミノピメリン酸エピメラーゼ遺伝子）の4遺伝子については、これらの遺伝子産物が関与する反応を単独で触媒し得るブレヴィバクテリウム ラクトファーメンタム（*Brevibacterium lactofermentum*）のDDH（ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ）をコードする遺伝子DDHで代替した。すなわち、導入したL-リジン生合成系酵素遺伝子とそれらがコードする酵素は次のとおりである。

ppc : ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ

aspC : アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ

lysC : アスパルトキナーゼIII

lysC* : 阻害解除型アスパルトキナーゼIII

asd : アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ

dapA : ジヒドロジピコリン酸シンターゼ

dapA* : 阻害解除型ジヒドロジピコリン酸シンターゼ

dapB : ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ

DDH : ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ (ブレビバクテリウム ラクトフ
ァーメンタム由来)

lysA : ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ

E. coliに各遺伝子を個別に導入した結果、lysC*、dapAあるいはdapA*を導入した株にL-リジン生産が認められ、dapA*導入株が最も高いL-リジン生産性を示した。この結果から、dapAが触媒する反応が第一の律速段階であることがわかった。次に、dapA*導入株に各L-リジン生合成系遺伝子を導入したところ、lysC*が最もL-リジン生産性向上に効果があり、lysCが触媒する反応が第2の律速段階であることがわかった。同様に、dapBが触媒する反応が第3の律速段階、DDHが触媒する反応が第4の律速段階であることがわかった。さらに、DDHで代替されたdapC、dapD、dapE及びdapFによる反応の間の律速段階を調べた結果、dapD及びdapEが律速となっていることがわかった。

以下に、E. coliのL-リジン生合成系遺伝子、及びブレビバクテリウム ラクトファーメンタムのDDH遺伝子の取得法を例示する。

ppc遺伝子は、この遺伝子を有するプラスミドpS2 (Sabe, H. et al., Gene, 31, 279 (1984))、あるいはpT2から得ることができる。pS2をAatIIとAflIIIで切断することにより、ppc遺伝子を有するDNA断片が得られる。また、pT2をSmaIとScaIで切断することによってもppc遺伝子を有するDNA断片を得ることができる。pT2を保持するE. coli F15株 (AJ12873) は、工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号) に、FERM BP-4732の受託番号のもとでブダペスト条約に基づいて国際寄託されている。

aspC遺伝子は、この遺伝子を有するプラスミドpLF4 (Inokuchi, K. et al., N

ucleic Acids Res., 10, 6957 (1982)) から得られる。pLF4をPvuIIとStuIで切断すると、aspC遺伝子を有するDNA断片が得られる。

asd遺伝子は、この遺伝子を有するプラスミドpAD20 (Haziza, C. et al., EMB 0, 1, 379 (1982)) から得られる。pAD20をAseIとClaIで切断すると、asdを有するDNA断片が得られる。

dapB遺伝子は、既知のdapB遺伝子のヌクレオチド配列 (Bouvier, J. et al., J. Biol. Chem., 259, 14829 (1984)) をもとに作成した2種のオリゴヌクレオチドプライマー (例えば、配列番号9、10) を用いたPCR法により、E. coli染色体DNAを増幅することによって得られる。

DDH遺伝子は、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) のDDH遺伝子の既知のヌクレオチド配列 (Ishino, S. et al., Nucleic Acids Res., 15, 3917 (1987)) をもとに作成した2種のオリゴヌクレオチドプライマー (例えば、配列番号11、12) を用いたPCR法により、ブレヴィバクテリウム ラクトファーマンタムの染色体DNAを増幅することによって得られる。

lysA遺伝子は、既知のlysA遺伝子のヌクレオチド配列 (Stragier, P. et al., J. Mol. Biol., 168, 321 (1983)) をもとに作成した2種のオリゴヌクレオチドプライマー (例えば、配列番号13、14) を用いたPCR法により、E. coli染色体DNAを増幅することによって得られる。

dapD遺伝子は、既知のdapD遺伝子のヌクレオチド配列 (Richaud, C. et al., J. Biol. Chem., 259, 14824 (1984)) をもとに作成した2種のオリゴヌクレオチドプライマー (例えば、配列番号15、16) を用いたPCR法により、E. coli W3110株染色体DNAを増幅することによって得られる。

dapE遺伝子は、既知のdapE遺伝子のヌクレオチド配列 (Bouvier, J. et al., J. Bacteriol., 174, 5265 (1992)) をもとに作成した2種のオリゴヌクレオチドプライマー (配列番号17、18) を用いたPCR法により、E. coli DNAを増幅することによって得られる。

dapF遺伝子は、既知のdapF遺伝子のヌクレオチド配列 (Richaud, C. et al., Nucleic Acids Res., 16, 10367 (1988)) をもとに作成した2種のオリゴヌクレオチドプライマー (例えば、配列番号19、20) を用いたPCR法により、E. coli

i染色体DNAを増幅することによって得られる。

本発明において宿主として用いるエシェリヒア属細菌としては、その細胞内で変異型DDPS遺伝子及び変異型AKIII遺伝子、もしくは他のL-リジン生合成系遺伝子のプロモーター又はこれらの遺伝子を発現させるための他のプロモーターが機能し、さらに変異型DDPS遺伝子、変異型AKIII遺伝子、あるいは他のL-リジン生合成系遺伝子をプラスミド上に染色体外DNAとして導入する場合には、導入するのに用いるベクターDNAの複製起点が細胞内で機能して複製可能なものであれば利用できる。

例えば、L-リジン生産性のE. coli、具体的にはL-リジンアナログに耐性を有する変異株が例示できる。このL-リジンアナログは、エシェリヒア属細菌の増殖を阻害するようなものであるが、その抑制はL-リジンが培地中に共存すれば、全体的または部分的に解除されるようなものである。例えば、オキサリジン、リジンヒドロキサメート、AEC、 γ -メチルリジン、 α -クロロカプロラクタム等がある。これらのリジンアナログに耐性を有する変異株は、通常の人工変異操作をエシェリヒア属の微生物に施すことにより得られる。L-リジン製造に用いる菌株として、具体的には、エシェリヒア・コリ AJ 11442 (FERM BP-1543 及び NRRL B-12185) として寄託されている。特開昭56-18596号及び米国特許第4346170号参照) が挙げられる。以上の微生物のアスパルトキナーゼは、L-リジンによるフィードバック阻害が解除されている。

その他にも、たとえばL-スレオニン生産菌が挙げられる。L-スレオニン生産菌も、一般的にはそのアスパルトキナーゼのL-リジンによる阻害が解除されているからである。E. coliのL-スレオニン生産菌としては、B-3996株が現在知られている内で最も高い生産能を持っている。B-3996株は、Research Institute for Genetics and Industrial Microorganism Breedingに、登録番号RIA 1867のもとに寄託されている。

本発明による変異型遺伝子を保持する形質転換体の培養に使用する培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地である。

炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースもしくはでんぶんの加水分解物などの糖類、グリセロールもしくはソルビトールなどのアルコール類、またはフマル酸、クエン酸もしくはコハク酸等の有機酸類を用いることができる。

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムもしくはリン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、またはアンモニア水等を用いることができる。

有機微量栄養源としては、ビタミンB₁、L-イソロイシンなどの要求物質または酵母エキスを適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

培養は、好氣的条件下で16～72時間実施するのがよく、培養温度は25℃～45℃に、培養中pHは5～8に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

発酵液からのL-リジンの採取は通常イオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

図面の簡単な説明

図1は、pdapA1とpdapA2の製造工程を示す図である。

図2は、野生型及び変異型DDPSのL-リジンによる阻害を示す図である。

図3は、二重変異型dapA*遺伝子を有するプラスミドpdapAS824の製造工程を示す図である。

図4は、pLYSC1とpLYSC2の製造工程を示す図である。

図5は、ヒドロキシルアミン処理後の形質転換体の出現率と変異率を示す図である。

図6は、野生型及び変異型AKIIIのL-リジンによる阻害を示す図である。

図7は、dapA*24を有するRSF1010由来のプラスミドRSF24Pの製造工程を示す図である。

図8は、プラスミドpLLC*80の製造工程を示す図である。

図9は、dapA*24及びlysC*80を有するRSF1010由来のプラスミドRSFD80の製造工程を示す図である。

図10は、dapA又はdapA*を有するプラスミドpdapA及びpdapA*の構造を示す図である。

図11は、lysC又はlysC*80を有するプラスミドplysC及びplysC*の構造を示す図である。

図12は、ppcを有するプラスミドpppcの構造を示す図である。

図13は、aspCを有するプラスミドpaspCの構造を示す図である。

図14は、asdを有するプラスミドpasdの構造を示す図である。

図15は、dapBを有するプラスミドpdapBの構造を示す図である。

図16は、DDHを有するプラスミドpDDHの構造を示す図である。

図17は、lysAを有するプラスミドplysAの構造を示す図である。

図18は、dapA*24、lysC*80及びdapBを有するRSF1010由来のプラスミドpCAB1の製造工程を示す図である。

図19は、dapA*24、lysC*80、dapB及びDDHを有するRSF1010由来のプラスミドpCABD2の製造工程を示す図である。

図20は、dapDを有するプラスミドpdapDの構造を示す図である。

図21は、dapEを有するプラスミドpdapEの構造を示す図である。

図22は、dapFを有するプラスミドpdapFの構造を示す図である。

図23は、dapD及びdapEを有するプラスミドpMwdapDE1の製造工程を示す図である。

図24は、dapA*24、lysC*80、dapB、dapD及びdapEを有するプラスミドpCABDE1の製造工程を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明する

実施例 1 変異型DDPS遺伝子の取得

< 1 > 野生型dapA遺伝子のクローニング

E. coliのdapA遺伝子の塩基配列は既に報告されており (Richaud, F. et al., J. Bacteriol., 297(1986))、オープンリーディングフレーム(ORF)は876塩基対であり、292アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしていることがわかっている。このdapA遺伝子がどのように調節されているか不明であるため、プロモーター領域を除き、SD配列とORFのみを含む領域をPCR法を用いて増幅し、クローニングすることにした。

E. coli K-12 MC1061株の全ゲノムDNAを斎藤、三浦の方法 (Biochem. Biophys. Acta., 72, 619(1963)) により回収し、配列番号1及び2に示す配列を有する2種のプライマーを作製し、これらを用いて、エルリッチらの方法 (PCR Technology, Stockton press (1989)) に従ってPCR反応を行い、目的DNAの増幅を行った。得られたDNAをそのまま市販のPCR断片用クローニングベクターpCR1000 (Invitrogen社 (米国カルフォルニア州) より購入) に挿入した。pCR1000はlacZプロモーター (Placz) を含有しており、lacZプロモーターの下流の部位で切断した状態で市販されている。このpCR1000の両切断末端の間にPCR断片を連結して得られる組換えDNAをE. coliに導入すると、lacZプロモーター制御下でPCR断片が転写される。PCR断片をpCR1000に連結する際、このlacZプロモーターによる転写方向に対してdapAの転写の向きが正方向となるように連結されたプラスミドとしてpdapA1、逆方向となるように連結されたプラスミドとしてpdapA2の2種のプラスミドを得た (図1)。

これらのプラスミドをDDPS欠損株であるE. coli JE7627に導入したところ、プラスミドを導入された株は宿主であるJE7627のジアミノピメリン酸の要求性が相補されたので、両プラスミドに挿入されたDNA断片は、活性のあるDDPSをコードする遺伝子dapAを含有すると確認した。

pdapA1を野生型E. coli W3110株（国立遺伝学研究所（日本国静岡県三島市）から入手）に導入して得られる形質転換株をW3110/pdapA1、pdapA2をE. coli W3110株に導入して得られる形質転換株をW3110/pdapA2とそれぞれ命名した。そして以下の組成を有する最少培地M9にリジンのアナログであるAECを加え、これら2種の形質転換株をそれぞれ培養した。コントロールとしてプラスミドを導入していないW3110株も同培地で培養した。2種の形質転換株もプラスミドを持たないW3110株も、AECにより生育が抑えられたが、その生育阻害はL-リジンの添加によって回復した。

（最小培地 M9）

A : (20×M9)

Na₂HPO₄・12H₂O 303 g/L

KH₂PO₄ 60 g/L

NaCl 10 g/L

NH₄Cl 20 g/L

B : 1M MgSO₄

C : 50% Glucose

D : 1g/L Thiamine

上記A、B、C、Dを別々に滅菌し、A : B : C : D : 水 = 5 : 0.1 : 1 : 0.1 : 95 の割合で混合する。

< 2 > 変異型DDPS遺伝子(dapA*)の取得

L-リジンによる阻害が解除されたDDPSをコードするdapA*を含有するプラスミド保持株は、著量のAECが添加された最少培地M9上での生育が可能になると予想し、生育がAECに耐性となっている株を選択することによって、dapA*を含有するプラスミド保持株を選択することにした。

dapA*を効率よく取得するために、< 1 >で作製したpdapA1およびpdapA2上のdapAに変異処理を行なうことにした。

(1-2-1) dapA*を含有するプラスミド保持株の選択条件の検討

上記で得られたW3110/pdapA1株およびW3110/pdapA2株を、それぞれ種々の濃度のAECを含有するM9寒天平板培地上で培養した。そしてAECによる生育阻止濃度を調べ、dapA*を含有するプラスミド保持株の選択条件の検討を行なった。

各種濃度でAECを含むM9培地での形質転換体の生育を表1に示す。尚、表中の+は形質転換株が生育することを示し、-は生育しなかったことを示す。

表1

AEC濃度(mM)	W3110/pdapA1	W3110/pdapA2
250	-	-
125	-	-
60	-	-
30	-	-
15	+	-
8	+	+
4	+	+
2	+	+

pdapA1上のdapA遺伝子の転写方向はlacZプロモーターによる転写の方向と一致している(図1)。よってpdapA1上のdapA遺伝子はlacZプロモーターにより発現量が増幅されているため、dapAが野生型のままだでもかなり高濃度のAECに耐性であったが、pdapA2上のdapA遺伝子は転写方向がlacZプロモーターに対して逆方向であり、dapA自身のプロモーターも欠失しているため発現量が少なく、より低濃度のAECで生育が阻害されることがわかった(W3110/pdapA1株では30mM、W3110/pdapA2株では15mMの添加区で生育が抑えられた)。なお、この生育阻害はレージンの同時添加により消去されることを確認した。

したがって、変異導入対象にはpdapA2を用い、最少培地M9にAECを60mM添加したものを、dapA*を含有するプラスミド保持株の選択に用いた。以下、実施例1においてこの培地を選択培地という。

(1-2-2) ヒドロキシルアミンによるpdapA2のインビトロ変異処理

pdapA2プラスミドへの変異の導入には、プラスミドを直接ヒドロキシルアミンで処理するインビトロ変異処理法を用いた。

2 μ gのDNAを0.4Mヒドロキシルアミン中(0.1M KH_2PO_4 -1mM EDTA (pH6.0) 100 μ l、1M ヒドロキシルアミン-1mM EDTA (pH6.0) 80 μ l、DNA 2 μ g、水を加えて計200 μ lとする)で、75℃で1～4時間処理した。処理後のDNAをガラスパウダーで精製後、E. coli W3110に導入し、完全培地(L-broth: 1% Bacto trypton, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar)に撒き、コロニーを形成させた。これらを(1-2-1)で述べた選択培地にレプリカし、選択培地上でコロニーを形成するものを選択した。2度の実験で合計36株の変異プラスミドの候補が得られた。

こうして得られた候補株合計36株を、再度選択培地にスポットし、AEC耐性を確認した。

(1-2-3) dapA*遺伝子の単離及びdapA*産物の検討

上記36株から変異型pdapA2を回収し、これらと野生型pdapA2のそれぞれでdapA欠損株 JE7627を形質転換し、各形質転換株から無細胞抽出液を調製し、DDPSの酵素活性を測定した。

無細胞抽出液(粗酵素液)は次のようにして調製した。形質転換株を2×TY培地(1.6% Bacto trypton, 1% Yeast extract, 0.5% NaCl)で培養し、660 nmにおける濁度(OD_{660})が約0.8になったところで集菌した。菌体を0℃の条件下で、0.85%NaClで洗浄し、20mMリン酸カリウム緩衝液 pH7.5-400mM KClに懸濁し、超音波処理(0℃, 200W, 10分)で菌体を破碎した。菌体破碎液を0℃の条件下で、33krpmで1時間遠心し、上清をとってこれに80%飽和になるよう硫酸を添加し、0℃で一夜保存した後遠心し、ペレットを20mMリン酸カリウム緩衝液 pH7.5-400mM KClに溶解した。

DDPS酵素活性の測定は、Yugariらの方法(Yugari, Y. and Gilvarg, C. J. Biol. Chem. 240, 4710(1962))で行った。即ち下記組成の反応液の吸光度を、37℃で分光光度計中で経時的に270nmの波長で測定し、生じるジヒドロジピコリン酸を測

定した。ブランクとしては反応系からピルビン酸ナトリウムを除いたものとした。

(反応液組成)

50mM イミダゾール-HCl pH7.4

20mM L-アスパラギン酸セミアルデヒド

20mM ピルビン酸ナトリウム

酵素液

水 (バランス)

計 1.0ml

DDPSの酵素活性を測定する際、酵素反応液中に種々の濃度のL-リジンを加え、L-リジンによる阻害の度合を調べた。図2に示す様に、野生型DDPSはL-リジンによる阻害を受けた。野生型に比べてL-リジンによる阻害を受けにくくなったDDPSを有する形質転換株由来の変異プラスミドは、候補プラスミド36種中3種類であった。これらをそれぞれ、pdapAS8、pdapAS9およびpdapAS24と命名した。後の塩基配列の決定でpdapAS8とpdapAS9は同一変異を有することが判明した。

pdapAS8、pdapAS9およびpdapAS24上のdapA*にコードされる3種の変異型DDPSのL-リジンによる阻害の解除の度合は様々ではあったが、3種ともL-リジンによる阻害が解除されていた。酵素の比活性は、菌体の生育状況や試料の調製に影響されるが、いずれも野生型より若干の低下が見られた。しかし、育種素材としては実質的に問題となる程ではないと判断した。

(1-2-4) 変異型dapA遺伝子の塩基配列の決定

DNAシーケンサー ABI Model 373A (Applied Biosystems社製) を使用して、常法に従い、変異型dapA遺伝子の塩基配列の決定を行った。その結果、配列番号3に示す野生型dapA遺伝子の配列上で、pdapAS8及びpdapAS9は、487番目のCがTに、pdapAS24は597番目のCがTに変化していることが明かとなった。従って配列番号4に示すDDPSのアミノ酸配列において、pdapAS8及びpdapAS9のコードするDDPSは、81番目のアラニン残基がバリン残基に、pdapAS24のコ

ードするDDPSは、118番目のヒスチジン残基がチロシン残基に変化していることが明かとなった。

(1-2-5) 二重変異型dapAの作製

上述のように2種類の変異型dapA遺伝子が得られた。これらの変異は阻害の解除が相加的に働くかどうかを検証するために、2つの変異を同時に持つ変異型dapAを含有するプラスミドを作成した。作成の手順は図3に示す通りである。得られた二重変異プラスミドをpdapAS824と命名した。

実施例2 変異型AKIII遺伝子の取得

< 1 > 野生型lysC遺伝子のクローニング

E. coliのAKIII遺伝子(lysC)の塩基配列は既に報告されており(Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G. N., and Patte, J. C., J. Biol. Chem., 261, 1052(1986))、オープンリーディングフレーム(ORF)は1347塩基対よりなり、449アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしていることがわかっている。この遺伝子にはオペレーターが存在しL-リジンによる抑制を受けるため、このオペレーター領域を除くために、SD配列とORFのみを含む領域を、PCR法を用いて増幅し、クローニングすることにした。

E. coli K-12 MC1061 株の全ゲノムDNAを斎藤、三浦の方法(Biochem. Biophys. Acta., 72, 619(1963))により調製し、配列番号5及び6に示す配列を有する2種のプライマーを作製し、これらを用いてエルリッチらの方法(PCR Technology, Stockton press (1989))に従ってPCR反応を行い、lysC遺伝子の増幅を行った。得られたDNAをBamHIとAseIで消化した後、平滑末端にし、多コピーベクター-pUC18のSmaI部位に挿入した。このSmaI部位はベクター内に存在するlacZプロモーターの下流側に位置しており、pUC18のSmaI部位にDNA断片を挿入して得られる組換えDNAをE. coliに導入すると、lacZプロモーター制御による読み越し(リードスルー)転写により、挿入されたDNA断片が転写される。pUC18のSmaI部位にPCR断片を挿入する際、pUC18に含まれているlacZプロモーターによる転写方向に対してlysCの転写の向きが逆方向となるように挿入されたプラスミド

としてpLYSC1と、正方向となるように挿入されたプラスミドとしてpLYSC2の2種のプラスミドを得た(図4)。

これらのプラスミドでAKI、II、III完全欠損株であるE. coli GT3 (thrA101 6b, metLM1005, lysC1004)を形質転換したところ、GT3のホモセリンおよびジアミノピメリン酸の要求性が相補されたので、両プラスミドに挿入されたDNA断片は、活性のあるAKIIIをコードする遺伝子lysCを含有すると確認した。

pLYSC1をAK完全欠損株E. coli GT3に導入して得られる形質転換株をGT3/pLYSC1、pLYSC2をE. coli GT3に導入して得られる形質転換株をGT3/pLYSC2と命名した。最少培地M9に著量のL-リジンを加え、GT3/pLYSC1株およびGT3/pLYSC2株をそれぞれ培養した。GT3/pLYSC1株およびGT3/pLYSC2株ともに野生型のlysCを含有するプラスミドを保持し、同プラスミド上のlysCにコードされるAKIIIが唯一のAKである。著量のL-リジン存在下では唯一のAKである野生型AKIIIがL-リジンにより阻害されるために、両株ともL-スレオニン、L-イソロイシン、L-メチオニン、及びジアミノピメリン酸(DAP)の合成ができなくなり生育が抑えられた。

< 2 > 変異型AKIII遺伝子 (lysC*) の取得

L-リジンによる阻害の解除されたAKをコードするlysC*を含有するプラスミド保持株は、著量のL-リジンが添加された最少培地M9上での生育が可能になると予想し、生育がL-リジンあるいはL-リジンのアナログであるAECに耐性となっている株を選択することによって、lysC*を含有するプラスミド保持株を選択することにした。

lysC*を効率よく取得するために、< 1 >で作製したpLYSC1およびpLYSC2上のlysCに変異処理を行なうことにした。

(2-2-1) lysC*を含有するプラスミド保持株の選択条件の検討

GT3/pLYSC1株およびGT3/pLYSC2株をそれぞれ種々の濃度のL-リジンあるいはAECを含有するM9寒天平板培地上で培養を行なった。そしてL-リジンあるいはAECによる生育阻止濃度を調べ、lysC*を含有するプラスミド保持株の選択条件の検討を行なった。

各種濃度でL-リジンあるいはAECを含むM9培地での形質転換体の生育を表2に示す。尚、表中の+は形質転換株が生育したことを示し、±はやや生育したことを示し、-は生育しなかったことを示す

表 2

L-リジン濃度と生育

	0	0.2	0.4	0.8	1.5	3	6	12	25	50	100	200 (mM)
GT3/pLYSC1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GT3/pLYSC2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-

AEC濃度と生育

	0	0.2	0.4	0.8	1.5	3	6	12	25	50 (mM)
GT3/pLYSC1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GT3/pLYSC2	+	±	±	±	±	±	-	-	-	-

pLYSC2上のlysC遺伝子の転写はlacZプロモーターによる転写の方向と一致している(図4)。よってpLYSC2上のlysC遺伝子はlacZプロモーターで発現量が増幅されているためlysCが野生型のままだでもかなり高濃度のL-リジン、AECに耐性であったが、pLYSC1上のlysC遺伝子は転写方向がlacZプロモーターに対して逆方向であり、自身のプロモーターも欠失しているため発現量が少なく、より低濃度のL-リジン、AECで生育が阻害されることがわかった(GT3/pLYSC2株ではL-リジンについては100mMの添加区まで、AECについては3mMの添加区まで生育が抑えられなかったのに対し、GT3/pLYSC1株ではL-リジン、AECとも0.2mMの添加区で生育が完全に抑えられた)。なお、この生育阻害はホモセリン及びジアミノピメリン酸の同時添加により消去されることを確認した。

したがって、変異導入実験にはpLYSC1を用い、最少培地M9にL-リジン10mM、

もしくはAEC 0.2mMを添加したものを、lysC⁺を含有するプラスミド保持株の選択に用いた。以下、実施例2においてこの培地を選択培地という。

(2-2-2) ヒドロキシルアミンによるpLYSC1のインビトロ変異処理

pLYSC1プラスミドへの変異の導入には、プラスミドを直接ヒドロキシルアミンで処理するインビトロ変異処理法に加え、変異に多様性を与えるため、即ちヒドロキシルアミンによるシトシンからチミンへの変異以外の変異を期待して、プラスミドを保持した菌体をニトロソグアニジン (NTG) で処理した後プラスミドを抽出するインビボ変異処理法の2種の方法を用いた。

(ヒドロキシルアミンによるインビトロ変異処理)

2 μ gのDNAを0.4M ヒドロキシルアミン中 (0.1M KH₂PO₄-1mM EDTA (pH6.0) 100 μ l、1M ヒドロキシルアミン-1mM EDTA (pH6.0) 80 μ l、DNA 2 μ g、水を加えて計200 μ lとする) で、75℃の条件下で、1～4時間処理した。処理後のDNAをガラスパウダーで精製後、AK完全欠損株E. coli GT3株に導入し、完全培地 (L-broth: 1% Bacto trypton, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar) に撒きコロニーを形成させた。これを(2-2-1)で設定した選択培地にレプリカし、選択培地上に生育可能な株を選択し候補株とした。形質転換体の出現率と変異率は図5のような推移がみられた。4時間処理では0.5～0.8%とかなり高率で変異株が得られた。

(NTGによるインビボ変異処理)

pLYSC1をE. coli MC1061に導入し、菌体ごとNTG処理をおこなった。処理後の菌体を一夜培養して変異を固定した後プラスミドを抽出し、E. coli GT3に導入した。すなわち、形質転換株を2 \times TY培地 (1.6% Bacto trypton, 1% Yeast extract, 0.5% NaCl) で培養し、OD₆₆₀が約0.3になったところで集菌し、下記に示すTM緩衝液 (TM buffer) で洗浄した後、NTG液 (0.2mg/mlの濃度でNTGをTM bufferに溶解させて調製) に懸濁し、37℃で0～90分処理した。菌体をTM buffer及び2 \times TY培地で洗浄後、2 \times TY培地で一夜培養して変異を固定した後、菌体よりプラスミドDNAを抽出し、E. coli GT3株に導入し、候補株のスク

リーニングをインビトロ変異と同様に行い、リジン耐性 (Lys^R)、AEC耐性 (AEC^R) の変異体を得た。

(TM buffer)

Tris	50mM
マレイン酸	50mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	1g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1g/L
Ca(NO ₃) ₂	5mg/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.25mg/L

NaOHを用いてpH6.0に調整

上記で得られた候補株合計180株(ヒドロキシルアミン処理48株、NTG処理132株)を再度選択培地にスポットし、AEC及びL-リジン耐性を確認し153株を得た。培地中のアミノ酸蓄積パターンの違いに注目して、この153株を14群に分け各群の代表株を選んでAK活性を測定することにした。なお、ヒドロキシルアミン処理による変異株と、NTG処理による変異株との間ではAKの活性に大きな差はなかったので、それぞれを区別することなく以降の実験を行なった。

(2-2-3) lysC^{*}遺伝子の単離及びlysC^{*}産物の検討

上記14群の代表株として、No. 24, No. 43, No. 48, No. 60, No. 80, No. 117, No. 126, No. 149, No. 150, No. 156, No. 158, No. 167, No. 169, No. 172を選び、おののからpLYSC1に由来する変異型プラスミドを回収し、それぞれpLYSC1*24, pLYSC1*43, pLYSC1*48, pLYSC1*60, pLYSC1*80, pLYSC1*117, pLYSC1*126, pLYSC1*149, pLYSC1*150, pLYSC1*156, pLYSC1*158, pLYSC1*167, pLYSC1*169, pLYSC1*172と命名した。これらと野生型pLYSC1でAK完全欠損株GT3を形質転換し、各形質転換株から無細胞抽出液を調製し、AKIIIの酵素活性を測定した。

無細胞抽出液(粗酵素液)は次のようにして調製した。形質転換株を2×TY培地で培養し、OD₆₆₀が約0.8になったところで集菌した。菌体を0℃の条件下、0.02M KH₂PO₄(pH6.75)-0.03M β-メルカプトエタノールで洗浄し、超音波処理

(0℃, 100W, 30秒×4) で菌体を破碎した。菌体破碎液を 0℃の条件下、33krpmで 1 時間遠心し、上清をとりこれに 80%飽和になるよう硫酸を添加し、遠心後ペレットを 0.02M KH_2PO_4 (pH6.75)-0.03M β -メルカプトエタノールに溶解し、0℃で一夜保存した。

A K III 酵素活性の測定は、スタットマンらの方法にしたがった(Stadtman, E. R., Cohen, G. N., LeBras, G., and Robichon-Szulmajster, H., J. Biol. Chem., 236, 2033(1961))。すなわち、下記組成の反応液を 27℃で 45 分インキュベートし、 FeCl_3 溶液 (2.8N HCl 0.4ml + 12% TCA 0.4ml + 5% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ / 0.1N HCl 0.7ml) を加え発色させ、これを遠心後、上清の 540nm での吸光度を測定した。活性は 1 分間に生成するヒドロキサム酸の量で表示 (1U = 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$) した。モル吸光係数は 600 とした。尚、反応液からアスパラギン酸カリウムを除いたものをブランクとした。

(反応液組成)

reaction mixture *1	0.3ml
ヒドロキシルアミン溶液 *2	0.2ml
0.1M アスパラギン酸カリ (pH7.0)	0.1ml
酵素液	
水	(バランス)
	計 1.0ml

*1; 1M Tris-HCl (pH8.1) 9ml + 0.3M MgSO_4 0.5ml + 0.2M ATP (pH7.0) 5ml

*2; 8M ヒドロキシルアミン溶液を直前に KOH で中和したもの

A K の酵素活性を測定する際、酵素反応液中に種々の濃度の L-リジンを加え、L-リジンによる阻害の度合を調べた。結果を、図 6 及び表 3 に示した。尚、野生型及び No. 24, 43, 48, 60, 80, 117, 126 については図 6 A に、No. 149, 150, 156, 158, 167, 169, 172 については図 6 B に示した。

この結果が示すように、野生型 A K III は L-リジンによる阻害を非常に強く受け、L-リジン約 0.45mM で 50% 阻害され、5mM になるとほぼ 100% 阻害された。それに対し、今回得られた変異型 A K III は、解除の度合は様々ではあったが、14 種とも L-リジンによる阻害が解除されていた。特に No. 24, 80, 117, 169, 172 で

は、L-リジン100mMでも阻害はほとんどみられず、50%阻害濃度は野生型のそれと比較して200倍以上であった。また総蛋白当りの比活性は、菌体の生育状況や試料の調製に影響されるが、いずれもほとんどが野生型と同等もしくはそれ以上のものであり、変異導入による活性低下の問題はほとんどなかった(表3)。このことより、AKIIIの活性中心とL-リジンによる調節部位がそれぞれ独立していることが予想された。尚、表3中、阻害解除度(%)とは、反応液中L-リジン非存在下でのAK活性に対するL-リジン100mM存在下でのAK活性である。熱安定性(%)とは55℃で1.5時間処理後の活性保持率である。

表3

	比活性(U/mg prot.)	阻害解除度(%) *1	熱安定性(%) *2
野生型	0.0247	0	18
No. 117	0.0069	120	0
No. 24	0.0218	100	30
No. 80	0.0244	99	36
No. 172	0.0189	97	0
No. 169	0.0128	96	2
No. 150	0.0062	77	25
No. 126	0.0250	61	39
No. 149	0.0256	59	9
No. 167	0.0083	43	45
No. 48	0.0228	38	42
No. 60	0.0144	35	9
No. 158	0.0224	22	42
No. 156	0.0101	18	2
No. 43	0.0212	17	0

*1: L-リジン非存在下でのAK活性に対するL-リジン100mM存在下でのAK活性(%)

*2: 55℃で1.5時間処理後の活性保持率(%)

続いて変異型酵素の熱安定性を調べた。ある酵素を改良し活性を上げようとす

る場合、創成される酵素が細胞内で安定に保持されることが重要である。細胞内外でのプロテアーゼの活動の違いや、酵素をインビトロ保存するための保存用バッファーの影響などもあるため、インビトロの測定には問題もあるが、簡便のため1つのパラメーターとして変異型AKIIIの熱安定性についてインビトロで検討した。

AKIIIの失活温度を種々の条件で検討した結果から、55℃、90分処理後の活性保持率を測定することにした。表3に示すように、半数がむしろ野生型よりも優れていた。通常変異型酵素は野生型に比べ不安定なものが多いが、今回得られた変異型AKIIIには安定性が野生型を上回るものもあり、L-リジン生産の実用面でかなり有力と思われるものが多かった。

(2-2-4) 野生型lysCおよび変異型lysCの塩基配列の決定

DNA シークエンサー ABI Model 373A (Applied Biosystems社製) を使用して、常法に従い、今回取得した野生型lysC遺伝子の塩基配列の決定を行なった(配列番号7)。その結果、既に発表されている *E. coli* K-12 JC411株のlysCの配列 (Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G. N., and Patte, J. C., *J. Biol. Chem.*, 261, 1052(1986)) と6ヶ所(アミノ酸レベルでは2ヶ所)の相違があった。この6ヶ所の相違は使用菌株の違いによるものであると考えられる。

同様に、14種の変異型pLYSC1上にあるlysC*それぞれについて塩基配列を決定し、変異点を明らかにした。結果を表4に示す。表中、()内はヌクレオチドの変異に基づくアミノ酸残基の変異を示す。14種のうち全く同一の変異型が2組(No. 48とNo. 167、及びNo. 24とNo. 80)あったので、変異の種類は12種類であった。尚、No. 149, 150, 156, 158, 167, 169, 172 はヒドロキシルアミン処理、No. 24, 43, 48, 60, 80, 117, 126はNTG処理によって得た変異型であるが、変異のパターンはいずれもシトシンからチミンへの変異、あるいは裏鎖のシトシンからチミンへの変異による表鎖のグアニンからアデニンへの変異であった。

表 4 lysC*の変異点の特定

lysC*変異型	変異源*	変異点 (アミノ酸変化)
No. 126	N	GGT→GA*T (³²³ Gly→Asp)
No. 43	N	GGT→GA*T (³²³ Gly→Asp) GGC→GA*C (⁴⁰⁸ Gly→Asp)
No. 149	H	CGT→T*GT (³⁴ Arg→Cys) GGT→GA*T (³²³ Gly→Asp)
No. 48/167	N/H	CTC→T*TC (³²⁵ Leu→Phe)
No. 150	H	ATG→ATA* (³¹⁸ Met→Ile)
No. 172	H	⁷⁷⁵ C→T (サイレント) ATG→ATA* (³¹⁸ Met→Ile) GTG→A*TG (³⁴⁹ Val→Met)
No. 117	N	TCA→TT*A (³⁴⁵ Ser→Leu)
No. 158	H	GTG→A*TG (³⁴⁷ Val→Met)
No. 24/80	N/N	ACC→AT*C (³⁵² Thr→Ile)
No. 169	H	⁸²³ C→T (サイレント) ACC→AT*C (³⁵² Thr→Ile) TCT→TT*T (³⁶⁹ Ser→Phe)
No. 60	N	⁸⁵⁹ G→A (サイレント) GAA→A*AA (¹⁶⁴ Glu→Lys)
No. 156	H	ATG→ATA* (⁴¹⁷ Met→Ile) TGT→TA*T (⁴¹⁹ Cys→Tyr) ²⁰¹⁴ C→T (サイレント)

* H ; ヒドロキシルアミン処理 N ; NTG処理

実施例 3 dapA*を導入した株によるL-リジンの発酵生産

E. coliでL-リジンを生産させるためには、特開昭56-18596号公報、及び米国特許第4,346,170公報及びApplied Microbiology and Biotechnology, 15, p227-231(1982)に示されるように、DDPSを増強する宿主としては、アスパルトキナーゼがL-リジンによる阻害を受けなくなっているように変化している事が必須であるとされている。そのような株として、たとえばL-スレオニン生産菌があげ

られる。E. coliスレオニン生産菌としては、B-3996株が現在知られている内で最も高い生産能を持っている。そこで、dapA*を評価するに当たり、B-3996株を宿主に用いることとした。B-3996株は、染色体外に唯一のプラスミドとしてpVIC40を保持する。詳細は特表平3-501682号公報に記載されている。当該微生物は、Reserch Institute for Genetics and Industrial Microorganism Breedingに、登録番号RIA 1867のもとに寄託されている。

また、E. coliに導入するdapA*としては、酵素の阻害解除度、比活性より判断して、pdapAS24に含まれているdapA*（118番目のヒスチジン残基がチロシン残基に変異しているもの）を選択した。まず、dapA*の発現量を増すためと、プラスミドの安定性を増すために、pdapAS24上にあった変異型dapA*（以下、「dapA*24」という）をpVIC40のテトラサイクリン耐性遺伝子プロモーターの下流に連結し、図7に示す様にしてRSF24Pを得た。

RSF24PプラスミドをE. coli JM109株に導入したものは、AJ12395と命名され、1993年10月28日に工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-13935として寄託され、1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4858の受託番号のもとで寄託されている。pdapAS8およびpdapAS9を保持する株は寄託しなかったが、各プラスミド上のdapA*の変異点は前述の通りすべて明らかになっているので、上記寄託菌よりプラスミドをマニアティスらの方法（Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.21(1989))により回収し、サイト・ダイレクテッド・ミュータジェネシス法（Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15.63(1989))により目的遺伝子を得ることは当業者にとり容易である。

B-3996株からpVIC40を常法に従い脱落させて、プラスミドを有しない株としてB-399株を取得した。RSF24Pプラスミドを常法にしたがいB-399株に導入し、B-399/RSF24Pを得た。B-399/RSF24PのL-リジン生産性について評価を行なった。

一方、コントロールのプラスミドとしてRSFPを構築した。すなわち、図7に示すpVIC40のBamHIおよびDraIによる二重消化物より大断片を選択し、こ

れをDNAポリメラーゼ クレノー・フラグメントによって平滑末端化処理した。平滑末端化処理した大断片を自己連結させてプラスミドRSFPを得た。B-399株にRSFPを常法に従い導入し、B-399/RSFPを得た。B-399/RSFPについてもL-リジン生産性の評価を行った。

培養は、以下の培地を用い、培養時間48時間、温度37℃の条件下、攪拌114～116rpmで行った。結果を表5に示す。

(L-リジン生産培地)

A : (NH ₄) ₂ SO ₄	16 g/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g/L
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.01 g/L
Yeast Ext. (Difco)	2 g/L
L-メチオニン	0.5 g/L
L-スレオニン	0.1 g/L
L-イソロイシン	0.05 g/L

KOHでpH7.0に調整し、115℃で10分オートクレーブ (16/20容)

B : 20% Glucose (115℃で10分オートクレーブ) (4/20容)

C : 局方 CaCO₃ (180℃で2日間乾熱滅菌) (30g/L)

A : Bを4 : 1で混合し、1 Lに対してCを30 g加えて溶解し、抗生物質 (ストレプトマイシン 100 μg/ml, カナマイシン 5 μg/ml) を加える。

表 5

菌 株	L-リジン塩酸塩の生産量
B-399/RSF24P	4.1 g/L
B-399/RSFP	0 g/L

実施例 4 dapA*及びlysC*を導入した株によるL-リジンの発酵生産(I)

実施例 3 で変異型 D D P S の L-リジン生産に対する効果が示されたが、これをさらに改良するために、実施例 2 で得られた変異型 A K I I I 遺伝子を変異型 D D P S 遺伝子と共存させる事とした。変異型 D D P S 遺伝子と共存させる変異型 A K I I I 遺伝子としては、酵素活性、熱安定性等から No. 80 株由来のもの (lys C*80) を選択した。

lys C*80 は、lys C* の発現量を増すために pLYSC1*80 上にあった lys C* (以下、「lys C*80」という) を pUC18 に対して逆位の挿入部位を有するベクター pHSG399 (宝酒造社製) の lacZ プロモーターの下流につなぎかえることにより作成されたプラスミド pLLC*80 (図 8) から切り出したものを使用した。pLLC*80 は、pLYSC1*80 上の lys C*80 が、転写方向が lacZ プロモーターに対して逆方向に配置されているので、L-リジンの生産性を向上させるために、lacZ プロモーターに対して転写方向が正方向となるように lys C*80 を配置させるために作成されたプラスミドである。

pLLC*80 と、実施例 3 で得られた R S F 2 4 P から、dapA* 及び lys C* を有するプラスミド R S F D 8 0 を図 9 の様にして作製した。R S F D 8 0 は、テトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター (tetP) の下流に、tetP に対して転写方向が正方向となるように dapA*24 及び lys C*80 がこの順序で配置されている。

R S F D 8 0 プラスミドを E. coli JM109 株に導入したものを、A J 1 2 3 9 6 と命名した。A J 1 2 3 9 6 は、1993 年 10 月 28 日に工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M P-13936 として寄託され、1994 年 11 月 1 日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859 の受託番号のもとで寄託されている。pLYSC1*24, LYSC1*43, pLYSC1*48, pLYSC1*60, pLYSC1*117, pLYSC1*126, pLYSC1*149, pLYSC1*150, pLYSC1*156, pLYSC1*158, pLYSC1*167, pLYSC1*169, pLYSC1*172 を保持する株は寄託しなかったが、各プラスミド上の lys C* の変異点は前記の通りすべて明らかになっているので、上記寄託菌よりプラスミドをマニアティスらの方法 (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.21(1989))

により回収し、サイト・ダイレクトッド・ミュータジェネシス法 (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15. 63(1989)) により目的遺伝子を得ることは当業者にとり容易である。RSFD80を常法にしたがいB-399株に導入し、B-399/RSFD80を得た。B-399/RSFD80のL-リジン生産性について評価を行なった。コントロールとして、B-399/RSFPについてもL-リジン生産性の評価を行った。

培養は、実施例3と同様のL-リジン生産培地を用い、培養時間48時間、温度37℃の条件下、攪拌114~116rpmで行った。結果を表6に示す。

表 6

菌 株	L-リジン塩酸塩の生産量
B-399/RSFD80	9. 2 g / L
B-399/RSFP	0 g / L

実施例5 $dapA^*$ 及び $lysC^*$ を導入した株によるL-リジンの発酵生産 (II)

エシェリヒア属細菌に変異型 $dapA$ 遺伝子と、変異型 $lysC$ 遺伝子を保持させて、L-リジンの生産性が改善できることが実施例4で確認された。この効果が、宿主を変更した場合にも維持されるかどうかを実験した。

宿主には、E. coli W3110($tyrA$)株を用いた。W3110($tyrA$)株は欧州特許公開92年488424号公報に詳しい記載があるが、その調製方法について簡単にふれると以下の通りである。国立遺伝学研究所(静岡県三島市)よりE. coli W3110株を入手した。同株をストレプトマイシン含有のLBプレートにまき、コロニーを形成する株を選択してストレプトマイシン耐性株を取得した。選択したストレプトマイシン耐性株と、E. coli K-12 ME8424株を混合して、完全培地(L-Broth: 1% Bacto trypton, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl)で37℃の条件下、15分間静置培養して接合を誘導した。E. coli K-12 ME8424株は、(HfrP045,

thi, relA1, tyrA::Tn10, ung-1, nadB) の遺伝形質を有し、国立遺伝学研究所より入手できる。

その後で培養物を、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよびＬーチロシンを含有する完全培地（L-Broth: 1% Bacto trypton, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar）にまき、コロニーを形成する株を選択した。この株を、*E. coli* W3110(*tyrA*)株と命名した。

ところで、欧州特許公開 92 年 4 8 8 4 2 4 号公報には、W3110(*tyrA*)株にプラスミドを導入して形成される株が多く記載されている。例えば、プラスミド *pHATerm* を導入して得られる株は、*E. coli* W3110(*tyrA*)/*pHATerm* 株と命名され、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、登録番号 F E R M B P - 3 6 5 3 が付与されている。この *E. coli* W3110(*tyrA*)/*pHATerm* 株からプラスミド *pHATerm* を脱落させることによって W3110(*tyrA*)株を取得することができる。プラスミドの脱落は常法によって行うことができる。

前記のようにして得られた W3110(*tyrA*)株に、実施例 4 で得られた *dapA** と *lysC** をともに含有するプラスミド *RSFD80* を導入し、W3110(*tyrA*)/*RSFD80* を得た。W3110(*tyrA*)/*RSFD80* の L-リジン生産性について評価を行なった。コントロールとして、W3110(*tyrA*)株に *RSFP* を常法に従い導入し、W3110(*tyrA*)/*RSFP* を得た。W3110(*tyrA*)/*RSFP* についても L-リジン生産性の評価を行った。

培養は、前記 L-リジン生産培地を用い、培養時間 48 時間、温度 37℃ の条件下、攪拌 114～116rpm で行った。結果を表 7 に示す。

表 7

菌 株	L-リジン塩酸塩の生産量
W3110(<i>tyrA</i>)/ <i>RSFD80</i>	8.9 g / L
W3110(<i>tyrA</i>)/ <i>RSFP</i>	0 g / L

実施例6 L-リジン生合成系の律速段階の解析及び
L-リジン産生エシェリヒア属細菌のL-リジン生産性の向上

E. coliのL-リジン生合成系の律速段階を解析し、その段階を触媒する酵素の遺伝子を増強することによって、L-リジン生産性の向上を試みた。

< 1 > 第一律速段階の特定

(6-1-1) L-リジン生合成系遺伝子の取得

律速段階の特定は、各種リジン生合成系遺伝子を単離し、それらの遺伝子をE. coliに導入し、それぞれの遺伝子のL-リジン生産能に対する効果を調べることによって行った。導入したL-リジン生合成系酵素遺伝子とそれらがコードする酵素は次のとおりである。

- ppc : ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ
- aspC : アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
- lysC : アスパルトキナーゼIII
- lysC*80 : 阻害解除型アスパルトキナーゼIII
- asd : アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ
- dapA : ジヒドロジピコリン酸シンターゼ
- dapA*24 : 阻害解除型ジヒドロジピコリン酸シンターゼ
- dapB : ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ
- DDH : ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ (ブレヴィバクテリウム ラクト
ファーメンタム由来)
- lysA : ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ

以上の遺伝子でホスホエノールピルビン酸からL-リジンに至るL-リジン生合成系が網羅できる。尚、本来E. coliが保持するL-リジン生合成系遺伝子のうち、dapC、dapD、dapE及びdapF遺伝子は、これらの遺伝子産物が関与する反応を単独で触媒し得るブレヴィバクテリウム ラクトファーメンタム (Brevibacterium lactofermentum) の DDH (ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ) をコードする

遺伝子DDHで代替することにした。また、これらの遺伝子を導入する宿主としては、*E. coli* K-12 系の W3110(*tyrA*)株を用いた。

*dapA*及び*dapA**24遺伝子は、それぞれ*pdapA2*及び*pdapAS24*（実施例1参照）から *EcoRI*及び*KpnI*で切り出すことによって得た（図10）。これらの遺伝子を*EcoRI*及び*KpnI*で消化したpMW118と連結して*pdapA*及び*pdapA**を得た。また、*lysC*及び*lysC**80遺伝子は、それぞれpLYSC1及びpLLC*80（実施例2参照）から *EcoRI*及び*SphI*で切り出すことによって得た。これらの遺伝子を*EcoRI*及び*SphI*で消化したpMW119と連結して*plysC*及び*plysC**を得た（図11）。

*ppc*遺伝子は、この遺伝子を有するプラスミドpT2から得た。pT2を*SmaI*と*ScaI*で切断し、末端を平滑化した後、pMW118の*SmaI*部位に挿入し、プラスミドpppcを得た（図12）。pT2を保持する*E. coli* F15株（AJ12873）は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-4732の受託番号のもとに寄託されている。

*aspC*遺伝子は、この遺伝子を有するプラスミドpLF4（Inokuchi, K. et al., *Nucleic Acids Res.*, 10, 6957 (1982)）から得た（図13）。pLF4を*PvuII*と*StuI*で切断し、末端を平滑化した後、pMW119の*SmaI*部位に挿入し、プラスミド*paspc*を得た。

*asd*遺伝子は、この遺伝子を有するプラスミドpAD20（Haziza, C. et al., *EMB* 0, 1, 379 (1982)）から得た。pAD20を*AseI*と*ClaI*で切断し、末端を平滑化した後、pMW118の*SmaI*部位に挿入し、プラスミド*pasd*を得た（図14）。

*dapB*遺伝子は、既知の*dapB*遺伝子のヌクレオチド配列（Bouvier, J. et al., *J. Biol. Chem.*, 259, 14829 (1984)）をもとに作成した2種のオリゴヌクレオチドプライマー（配列番号9、10）を用いたPCR法により、*E. coli* W3110株染色体DNAから*dapB*遺伝子を増幅することによって得た（図15）。得られた増幅DNA断片を*AseI*と*DraI*で切断し、末端を平滑化した後、pMW119の*SmaI*部位に挿入し、プラスミド*pdapB*を得た。

DDH遺伝子は、*コリネバクテリウム グルタミカム* (*Corynebacterium glutamicum*) のDDH遺伝子の既知のヌクレオチド配列（Ishino, S. et al., *Nucleic Acids Res.*, 15, 3917 (1987)）をもとに作成した2種のオリゴヌクレオチドプライマー（配列番号11、12）を用いたPCR法により、*ブレヴィバクテリウム ラクト*

ファーマンタム ATCC13869 の染色体DNAからDDH遺伝子を増幅することによって得た。得られた増幅DNA断片をEcoT22IとAvaIで切断し、末端を平滑化した後、pMW119のSmaI部位に挿入し、プラスミドpDDHを得た(図16)。

lysA遺伝子は、既知のlysA遺伝子のヌクレオチド配列(Stragier, P. et al., J. Mol. Biol., 168, 321 (1983))をもとに作成した2種のオリゴヌクレオチドプライマー(配列番号13、14)を用いたPCR法により、E. coli W3110株染色体DNAからlysA遺伝子を増幅することによって得た。得られた増幅DNA断片をSphIとBclIで切断し、末端を平滑化した後、pMW118のSmaI部位に挿入し、プラスミドplysAを得た(図17)。

上記各遺伝子がクローニングされたことの確認は、図中に示された制限酵素で切断することにより行った。また、これらの遺伝子のクローニングに用いたベクターpMW118及びpMW119(ニッポンジーン製)は、後述するリジン生産用プラスミドの作製に使用したベクターであるRSF1010とE. coli細胞中で共存でき、安定分配機構も持つため、選択した。

(6-1-2) L-リジン生合成系遺伝子を導入したE. coliのL-リジン生産性

E. coli W3110(tyrA)を上記のL-リジン生合成系遺伝子を含む各プラスミドで形質転換し、得られた形質転換体を培養してL-リジン生産を行った。培養は以下の培地を用い、培養温度37℃、攪拌114~116rpmの条件下で30時間行った。結果を表8に示す。

(培地組成)

Glucose	40g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	16g/l
KH ₂ PO ₄	1g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01g/l
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.01g/l
Yeast Extract(Difco)	2g/l
L-チロシン	0.1g/l

KOH で pH7.0 に調整し、115℃で10分オートクレーブ (Glucose、
MgSO₄·7H₂Oは別殺)

局方CaCO₃ 25g/l (180℃で2日間乾熱滅菌)

抗生物質

(導入するプラスミドの種類に応じストレプトマイシン20mg/l、またはアンピシリン50mg/l)

表 8

菌 株	L-リジン塩酸塩の生産量(g/l)	対糖収率(%)
W3110(tyrA)	0.08	0.2
W3110(tyrA)/pppc	0.08	0.2
W3110(tyrA)/paspC	0.12	0.3
W3110(tyrA)/plysC	0.08	0.2
W3110(tyrA)/plysC*	2.27	5.57
W3110(tyrA)/pasd	0.12	0.3
W3110(tyrA)/pdapA	2.32	5.70
W3110(tyrA)/pdapA*	3.63	8.90
W3110(tyrA)/pdapB	0.08	0.2
W3110(tyrA)/pDDH	0.08	0.2
W3110(tyrA)/plysA	0.12	0.3

E. coli W3110(tyrA)は、plysC*、pdapAあるいはpdapA*の導入でL-リジンを生産するようになった。lysC産物、dapA産物ともにL-リジンによるフィードバ

ック阻害を受けることから、これらの酵素がL-リジン生合成における主要な調節点であることは予想できることである。dapA産物が触媒する反応は、L-スレオニン、L-メチオニン及びL-イソロイシンの合成系とL-リジン合成系との枝分かれの位置に存在し、L-リジン固有の合成系の最初の段階である。野生型dapAの増幅によってもE. coliがL-リジンを生産するようになることは既に報告されており (Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 15, 227 (1982))、それは上記の結果からも確認された。一方、E. coliに阻害解除型遺伝子であるdapA*を導入すると、さらにL-リジン収率が増すという実施例3の結果が再確認された。

W3110(tyrA)、W3110(tyrA)/pdapA及びW3110(tyrA)/pdapA*から実施例1と同様にして粗酵素液を調製し、DDPS (ジヒドロジピコリン酸シンターゼ) 活性を測定し、さらにDDPS活性のL-リジンによる阻害の度合いを調べた。結果を表9に示す。

表 9

菌 株	比活性* ¹	阻害解除度* ²
W3110(tyrA)	0.0423	50
W3110(tyrA)/pdapA	0.2754	22.9
W3110(tyrA)/pdapA*	0.1440	76.5

*1: $\mu\text{mols/min/mg protein}$

*2: L-リジン 5mM 存在時の活性保持率(%)

阻害解除型のdapA*産物は、野生型酵素に比べて比活性は低い(約1/2)、阻害解除度が高いために、L-リジン生産に与える効果が大きいものと思われ、L-リジン生産にとってdapA産物が阻害解除されることの必要性が示された。

またlysC*がL-リジン生産に効果があることについては以下のように考えることができる。第1の律速段階は、生合成系の枝分かれの点となる基質であるASA (アスパラギン酸- β -セミアルデヒド) を HD (ホモセリンデヒドロゲナーゼ: t

hrA又はmetLMの産物)とDDPS(dapA産物)が取り合う段階であり、上記のようにdapAを増強すると反応はL-リジン生合成の方向に流れる。一方、dapAよりさらに上流の反応に関与するlysCを増強することによってASAの供給量を増した場合も、HDとDDPSが関与するいずれの反応も増進するため、L-リジンの生産量も増加したものと考えられる。ただし、野生型のlysCのみの増強ではこの効果はほとんど得られない。その理由は、野生型AKIII(lysC産物)のL-リジンによる阻害が、野生型DDPSのそれに比べて厳格であるためであろう(L-リジン5mMの存在により、AKIIIはほぼ100%、DDPSは80%阻害される)。

以上のことから、L-リジン生産効果がより高いDDPSによる反応が第1律速段階であると判断し、さらにAKIIIによる反応が第2律速段階であると推定した。

< 2 > 第2律速段階の特定

dapA*が導入された株において、L-リジン生合成系の各種遺伝子を増強し、第2律速段階の特定を行った。dapA*を含むプラスミドを保持するE. coliに、他のプラスミドを導入したときに、これらのプラスミドが安定に保持されるように、dapA*をpdapAからRSF1010に移し、RSF24Pを得た(図7)。このdapA*を有するプラスミドRSF24PでE. coli W3110(tyrA)を形質転換した。

E. coli W3110(tyrA)/RSF24Pに、L-リジン生合成系遺伝子を有するプラスミドを導入した。得られた各形質転換体は、RSF24P及び他のL-リジン生合成系遺伝子を含むプラスミドの2種類のプラスミドが共存している。これらの株を、(6-1-2)と同様にしてL-リジン生産性を調べた。結果を表10に示す。

表10

菌 株	L-リジン塩酸塩の生産量(g/l)	対糖収率(%)
W3110(tyrA)/RSF24P	3.63	8.9
W3110(tyrA)/RSF24P+pppc	3.67	9.0
W3110(tyrA)/RSF24P+paspC	3.59	8.8
W3110(tyrA)/RSF24P+plysC	3.42	8.4
W3110(tyrA)/RSF24P+plysC*	9.17	22.5
W3110(tyrA)/RSF24P+pasd	3.75	9.2
W3110(tyrA)/RSF24P+pdapA	3.55	8.7
W3110(tyrA)/RSF24P+pdapA*	3.46	8.5
W3110(tyrA)/RSF24P+pdapB	4.08	10.0
W3110(tyrA)/RSF24P+pDDH	3.67	9.0
W3110(tyrA)/RSF24P+plysA	3.55	8.7

その結果、lysC*のみに顕著なL-リジン生産性増強効果がみられた。野生型のlysCでは全く効果がなく、その理由は先に述べたようにL-リジンによる阻害が強いと思われる。これによりlysC*が関与する反応が第2律速段階となることが確認された。

lysC*をRSF24Pに組み込み、RSFD80を得た(図9)。同様に、lysCをRSF24Pに組み込み、得られたプラスミドをRSFD1と命名した。これらのプラスミドをE. coli W3110(tyrA)に導入し、(6-1-2)と同様に粗酵素液を調製してAK活性及びAK活性のL-リジンによる阻害の度合いを調べた。結果を表11に示す。

表11

AK活性菌株	比活性* ¹	阻害解除度* ²
W3110(tyrA)/RSF24P	0.94	42.9
W3110(tyrA)/RSFD1	18.55	7.2
W3110(tyrA)/RSFD80	33.36	98.8

*1 : nmols/min/mg protein

*2 : L-リジン 5mM 存在時の活性保持率(%)

RSF24PにlysC、lysC*を組み込むことにより、このプラスミドを保持する株のAKの比活性は20～30倍に増加した。E. coli には AK は3種類あり、lysCはそのうちAKIIIをコードしているが、上記の実験では3種のAKの合計の活性を測定している。野生型lysCを組み込んだRSFD1を保持する株では、コントロール (W3110(tyrA)/RSF24P) に比べて、AKI、AKIIに対してAKIIIが占める割合が高いためにL-リジンによる阻害も高くなり、結果としてL-リジン生産能増強には効果を示さなかったと考えられる。一方、RSFD80を保持する株では、AKIIIのほぼ100%が阻害が解除されており、これがL-リジン生産の向上に寄与していることがわかった。

< 3 > 第3律速段階の特定

次に、E. coli W3110(tyrA)/RSFD80に各種L-リジン生合成系プラスミドを導入し、L-リジン生産培養を行った。培養結果を表12に示す。

表12

菌 株	L-リジン塩酸塩の生産量(g/l)	対糖収率(%)
W3110(tyrA)/RSFD80	9.17	22.5
W3110(tyrA)/RSFD80+pppc	8.97	22.0
W3110(tyrA)/RSFD80+paspC	9.05	22.2
W3110(tyrA)/RSFD80+plysC	8.56	21.0
W3110(tyrA)/RSFD80+plysC*	8.15	20.0
W3110(tyrA)/RSFD80+pasd	8.35	20.5
W3110(tyrA)/RSFD80+pdapA	8.56	21.0
W3110(tyrA)/RSFD80+pdapA*	8.15	20.0
W3110(tyrA)/RSFD80+pdapB	10.80	26.5
W3110(tyrA)/RSFD80+pDDH	8.56	21.0
W3110(tyrA)/RSFD80+plysA	8.48	20.8

dapBのみにL-リジン生産性増強効果がみられ、dapBが関与する反応が第3律速段階であることがわかった。そこで、dapBをRSFD80に組み込み、pCAB1を得た(図18)。このプラスミドをE. coli W3110(tyrA)に導入し、粗酵素液を調製して、

Tamir, H. and Gilvarg, C., J. Biol. Chem., 249, 3034 (1974)に記載の方法に従って、DDPR (ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ) の酵素活性を測定した。同様に、RSFD80のみを保持する株とRSFD80とpdapBを共に保持する株から粗酵素液を調製し、DDPR活性を測定した。結果を表13に示す。

表13

菌 株	比活性(μ mols/min/mg protein)
W3110(tyrA)/RSFD80	0.027
W3110(tyrA)/RSFD80+pdapB	0.092
W3110(tyrA)/pCAB1	0.178

DDPR活性は、コントロール (RSFD80のみ保持する株) に比べて、RSFD80及びpdapBを保持する株で約3倍、RSFD80にdapBを組み込みこんだpCAB1を保持する株では6.5倍に増加した。L-リジンの蓄積は、W3110(tyrA)/RSFD80+pdapB、W3110(tyrA)/pCAB1とも同等の10.8g/lであったことから、dapBはL-リジン生産には十分量であり、律速段階は次の段階に移ったと判断した。

< 4 > 第4律速段階の特定

次に、lysC^{*}、dapA^{*}及びdapBを有するプラスミドpCAB1を用いて、第4の律速段階の特定を行った。E. coli W3110(tyrA)/pCAB1に各種リジン生合成系プラスミドを導入し、L-リジン生産培養を行った。培養結果を表14に示す。

表14

菌 株	L-リジン塩酸塩の生産量(g/l)	対糖収率(%)
W3110(tyrA)/pCAB1	10.80	26.5
W3110(tyrA)/pCAB1+pppc	11.00	27.0
W3110(tyrA)/pCAB1+paspC	10.88	26.7
W3110(tyrA)/pCAB1+plysC	10.60	26.0
W3110(tyrA)/pCAB1+plysC*	10.39	25.5
W3110(tyrA)/pCAB1+pasd	10.19	25.0
W3110(tyrA)/pCAB1+pdapA	10.72	26.3
W3110(tyrA)/pCAB1+pdapA*	10.80	26.5
W3110(tyrA)/pCAB1+pdapB	10.92	26.8
W3110(tyrA)/pCAB1+pDDH	12.23	30.0
W3110(tyrA)/pCAB1+plysA	10.60	26.0

DDHのみにL-リジン生産性増強効果がみられ、DDHが触媒する反応が第4の律速段階となることがわかった。また、DDH非導入株の培養ブロス中に検出されたSDAP (N-スクシニル-L, L- α , ϵ -ジアミノピメリン酸) が、DDH導入株の培養ブロスには検出されなかった。尚、SDAPの検出はTLC展開によって行った(展開溶媒組成メタノール: 水: 10N HCl: ピリジン=80:17.5:2.5:10) (Bouvier, J., Richaud, C., Higgins, W., Bogler, O. and Stragier, P. J., Bacteriol., 174, 5265 (1992))。さらに、ブロスの色もDDH非導入株では茶色であったのが、DDH導入株では黄色に変化した。そこで、DDHをpCAB1に組み込んだプラスミドpCABD2を作製し(図19)、このプラスミドで形質転換したE. coli W3110(tyrA)のDDH活性を測定した。DDH酵素活性の測定は、文献(味園春雄 発酵と工業 45, 964(1987))に従って行った。結果を表15に示す。

表15

菌 株	比活性(μ mols/min/mg protein)
W3110(tyrA)/pCAB1	0.000
W3110(tyrA)/pCAB1+pDDH	0.799
W3110(tyrA)/pCABD2	2.214

E. coli には本来DDHが存在しないため、コントロール (W3110(tyrA)/pCAB1) ではDDH活性は検出されなかった。pCABD2保持株 (W3110(tyrA)/pCABD2) のDDHの比活性はpDDH保持株 (W3110(tyrA)/pCAB1+pDDH) の約2.5倍であるが、両株ともL-リジンの蓄積量は同等 (12.23g/l) であったので、pCABD2のDDH発現量は十分量であると判断した。

< 5 > dapC、dapD、dapE及びdapF間の律速段階の解析

次に、上記解析においてDDHで代替されたdapC、dapD、dapE及びdapFの律速順位を調べるため、まずこれらの遺伝子のクローニングを行った。dapCについては塩基配列についての報告がないためクローン化は行わなかったが、残り3種の遺伝子についてはPCR法にてクローニングを行った。

dapD遺伝子は、既知のdapD遺伝子のヌクレオチド配列 (Richaud, C. et al., J. Biol. Chem., 259, 14824 (1984)) をもとに作成した2種のオリゴヌクレオチドプライマー (配列番号15、16) を用いたPCR法により、E. coli W3110株染色体DNAからdapD遺伝子を増幅することによって得た。得られた増幅DNA断片をEco0109IとSacIで切断し、末端を平滑化した後、pMW118のSmaI部位に挿入し、プラスミドpdapDを得た (図20)。

dapE遺伝子は、既知のdapE遺伝子のヌクレオチド配列 (Bouvier, J. et al., J. Bacteriol., 174, 5265 (1992)) をもとに作成した2種のオリゴヌクレオチドプライマー (配列番号17、18) を用いたPCR法により、E. coli W3110株染色体DNAからdapE遺伝子を増幅することによって得た。得られた増幅DNA断片をMunIとBglIIで切断し、末端を平滑化した後、pMW118のSmaI部位に挿入し、プラス

ミドpdapEを得た(図21)。

dapF遺伝子は、既知のdapF遺伝子のヌクレオチド配列(Richaud, C. et al., Nucleic Acids Res., 16, 10367 (1988))をもとに作成した2種のオリゴヌクレオチドプライマー(配列番号19、20)を用いたPCR法により、E. coli W3110株染色体DNAからdapF遺伝子を増幅することによって得た。得られた増幅DNA断片をPstIで切断し、末端を平滑化した後、pMW118のSmaI部位に挿入し、プラスミドpdapFを得た(図22)。

上記のようにして得られた各プラスミドを、W3110(tyrA)/pCAB1に導入し、L-リジン生産培養を行った。先の実験で、DDHの導入前と後ではL-リジン生産量の他、ブロスの色、中間体(SDAP)の蓄積の有無についても変化がみられたため、これらも指標として、律速段階の解析を行った。結果を表16に示す。

表16

菌 株	L-リジン生産量 (g/l)	対糖収率 (%)	ブロスの色	SDAP の蓄積
W3110(tyrA)/pCAB1	10.80	26.5	茶	+
W3110(tyrA)/pCAB1+pdapD	11.08	27.2	黄	+
W3110(tyrA)/pCAB1+pdapE	11.12	27.3	茶	-
W3110(tyrA)/pCAB1+pdapF	10.96	26.9	茶	+
W3110(tyrA)/pCABD2	12.23	30.0	黄	-

L-リジンの生産量は、dapDあるいはdapEの増強によって若干増加したが、DDHには及ばなかった。また、DDHの導入により観察されたブロスの色の変化と中間体であるSDAPの蓄積は各々独立の現象であり、ブロスの色の変化はdapD、SDAPの消失はdapEに起因するものであることがわかった。dapEとSDAPの関係についてはL-リジン合成経路からみても予想のつくものである。dapFの増強は、L-リジン生産性向上には効果がみられなかった。

pdapEからdapEを切り出し、pdapDに挿入してdapE及びdapDを共に有するプラスミドpMWdapDE1を作製した(図23)。さらに、pMWdapDE1からdapE及びdapDを含む

断片を切り出し、これをpCAB1に挿入してpCABDE1を作製した（図24）。pCAB1、pCABDE1あるいはpCABD2を保持する株、及びpCABDE1とpdapFを共に保持する株を作製し、これらの株によりL-リジン生産培養を行った。結果を表17に示す。

表17

菌 株	L-リジン生産量 (g/l)	対糖収率 (%)	プロスの色	SDAP の蓄積
W3110(tyrA)/pCAB1	10.80	26.5	茶	+
W3110(tyrA)/pCABDE1	12.23	30.0	黄	-
W3110(tyrA)/pCABDE1+pdapF	11.82	29.0	黄	-
W3110(tyrA)/pCABD2	12.23	30.0	黄	-

dapD、dapEを組み合わせて増強することにより、L-リジン生産量、プロスの色、SDAPの蓄積の有無ともDDHの導入と同等になることがわかった。また、さらにdapFを増強してもL-リジン生産性向上には効果はなく、dapFが関与する反応は律速にはなっていないことがわかった。以上の結果は、以下のように解釈できる。

pCAB1を導入した段階で中間体はSKAP（N-スクシニル-ε-ケト-L-α-アミノピメリン酸）とSDAPの2段階で蓄積している。これらの中間体のうちSDAPについては菌体外のプロス中に検出された。SKAPは検出されなかったが、おそらく菌体内に蓄積していたものと考えられる。そう考えられる理由はプロスの色である。L-リジンを生産しない野生株（W3110(tyrA)）などではプロスの色は黄色であるが、生育に負担がかかると、溶菌などによりプロスが茶色になると考えられる。SDAPは菌体外に排出されているため生育に対する負担は小さく、したがって、dapDのみの増強によりSKAPが代謝されるとSDAPの蓄積量が増加するがプロスは黄色に改善したものと思われる。但し、dapDを増強しても、より下流のdapEによる律速が解除されないと、L-リジンの蓄積量は増加しない。

< 6 > まとめ

以上の結果から、エシェリヒア属細菌において、①dapA*の導入、②lysC*の導

入、③dapBの増強、④DDH、あるいはdapD及びdapEの増強、を行うことによって、段階的にL-リジン生産性が向上することがわかった。また、段階的にL-リジン生産性が向上したE. coliが得られた。

< 7 > E. coli C株におけるL-リジン生合成系の律速段階の解析

上記で得られた結論が、E. coli K-12系列以外の株においても適用できるかを調べるために、E. coli C株(IF013891)のL-リジン生合成系の律速段階の解析を上記と同様にして行った。尚、培養条件はW3110(tyrA)と同様にして行ったが、培地にはL-チロシンを添加しなかった。

(1) 第一律速段階の特定

L-リジン生合成系遺伝子を含むプラスミドで形質転換したE. coli C株(IF013891)をL-リジン生産培地で培養し、L-リジン塩酸塩の生産量を測定した。結果を表18に示す。

表18

菌 株	L-リジン塩酸塩の生産量(g/l)	対糖収率(%)
C	0.08	0.2
C/pppc	0.08	0.2
C/paspC	0.12	0.3
C/plysC	0.08	0.2
C/plysC*	0.12	0.3
C/pasd	0.08	0.2
C/pdapA	0.32	0.8
C/pdapA*	0.71	1.75
C/pdapB	0.12	0.3
C/pDDH	0.08	0.2
C/plysA	0.08	0.2

W3110(tyrA)の場合と同様に、C株においても野生型dapA、さらに阻害解除型dapA*の導入により、L-リジンを培地中に蓄積するようになった。lysC*は、L-リジン生産性に効果がなかった。

(2) 第2律速段階の特定

E. coli C株にdapA*を含むプラスミドRSF24Pを導入し、さらにL-リジン生合成系遺伝子を含むプラスミドを導入し、得られた形質転換体をL-リジン生産培地で培養し、L-リジン塩酸塩の生産量を測定した。結果を表19に示す。

表19

菌 株	L-リジン塩酸塩の生産量(g/l)	対糖収率(%)
C/RSF24P	0.71	1.75
C/RSF24P+pppc	0.71	1.74
C/RSF24P+paspC	0.69	1.70
C/RSF24P+plysC	0.65	1.60
C/RSF24P+plysC*	1.82	4.50
C/RSF24P+pasd	0.70	1.73
C/RSF24P+pdapA	0.71	1.75
C/RSF24P+pdapA*	0.69	1.70
C/RSF24P+pdapB	0.99	2.45
C/RSF24P+pDDH	0.73	1.80
C/RSF24P+plysA	0.69	1.70

dapA*を導入したC株でも、L-リジン生産性向上に効果があるのはlysC*であり、lysC*が関与する反応が第2律速段階であることがわかった。

(3) 第3律速段階の特定

E. coli C株にdapA*及びlysC*を含むプラスミドRSFD80を導入し、さらにL-リジン生合成系遺伝子を含むプラスミドを導入し、得られた形質転換体をL-リジン生産培地で培養し、L-リジン塩酸塩の生産量を測定した。結果を表20に示す。

表20

菌 株	L-リジン塩酸塩の生産量(g/l)	対糖収率(%)
C/RSFD80	1.82	4.5
C/RSFD80+pppc	1.74	4.3
C/RSFD80+paspC	1.82	4.5
C/RSFD80+plysC	1.91	4.7
C/RSFD80+plysC*	1.74	4.3
C/RSFD80+pasd	1.82	4.5
C/RSFD80+pdapA	1.95	4.8
C/RSFD80+pdapA*	1.91	4.7
C/RSFD80+pdapB	2.31	5.7
C/RSFD80+pDDH	2.15	5.3
C/RSFD80+plysA	1.95	4.8

W3110株同様に、dapBのみにL-リジン生産性向上に効果があり、第3律速段階であることがわかった。

(4) 第4律速段階の特定

E. coli C株にdapA*、lysC*及びdapBを含むプラスミドpCAB1を導入し、さらにL-リジン生合成系遺伝子を含むプラスミドを導入し、得られた形質転換体をL-リジン生産培地で培養し、L-リジン塩酸塩の生産量を測定した。結果を表21に示す。

表21

菌 株	L-リジン塩酸塩の生産量(g/l)	対糖収率(%)
C/pCAB1	2.31	5.7
C/pCAB1+pppc	2.23	5.5
C/pCAB1+paspc	2.35	5.8
C/pCAB1+plysC	2.27	5.6
C/pCAB1+plysC*	2.19	5.4
C/pCAB1+pasd	2.23	5.5
C/pCAB1+pdapA	2.31	5.7
C/pCAB1+pdapA*	2.27	5.6
C/pCAB1+pdapB	2.23	5.5
C/pCAB1+pDDH	2.59	6.4
C/pCAB1+plysA	2.19	5.4

W3110株同様に、DDHのみにL-リジン生産性向上に効果があり、第4律速段階であることがわかった。

(5) dapC、dapD、dapE及びdapF間の律速段階の解析

pCAB1を保持するE. coli C株に、DDHの代わりにdapD、dapEあるいはdapF遺伝子を有するプラスミドを導入し、L-リジン生産培養を行った。結果を表22に示す。

表22

菌 株	L-リジン塩酸塩の生産量 (g/l)	対糖収率 (%)	プロモ の色	SDAP の蓄積
C/pCAB1	2.31	5.7	茶	+
C/pCAB1+pdapD	2.43	6.0	黄	+
C/pCAB1+pdapE	2.35	5.8	茶	-
C/pCAB1+pdapF	2.23	5.5	茶	+
C/pCABDE1	2.59	6.4	黄	-
C/pCABDE1+pdapF	2.43	6.0	黄	-
C/pCABD2	2.59	6.4	黄	-

C株においても、W3110株同様にdapD及びdapEの2段階が律速となっていることがわかった。

以上のように K-12、Cと系列の異なる株でも同様の律速順位であったことから、dapA*、lysC*の導入、dapB、DDH（又はdapD及びdapE）の増強をこの順に行うことによって、L-リジン生産性を段階的に向上させることができるという概念は、E. coli全般に適用できるものと思われる。

産業上の利用性

本発明により、L-リジンによるフィードバック阻害が十分に解除されたエシエリヒア属細菌由来のDDPS変異遺伝子が得られた。この遺伝子を、L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼを保持するエシエリヒア属細菌に導入することにより、従来よりもさらに改良されたL-リジン生産菌を得ることができた。

さらに、上記L-リジン生産菌のdapB、DDH（又はdapD及びdapE）をこの順に増強することにより、L-リジン生産性を段階的に向上させることができる。

配列表

(1) 一般情報

- (i) 出願人：味の素株式会社
- (ii) 発明の名称：発酵法によるL-リジンの製造法
- (iii) 配列数：20
- (iv) 連絡先：
 - (A) 宛名：
 - (B) 番地：
 - (C) 市：
 - (D) 州：
 - (E) 国：
 - (F) ZIP：
- (v) コンピュータ読取り可能形式
 - (A) 媒体：フロッピーディスク
 - (B) コンピュータ：IBM PC 互換
 - (C) 操作システム：PC-DOS/MS-DOS
 - (D) ソフトウェア：PatentIn
- (vi) 現行出願データ
 - (A) 出願番号
 - (B) 出願日
 - (C) 分類
- (viii) 代理人／事務所情報
 - (A) 名前：
 - (B) 登録番号：
 - (C) 整理番号：
- (ix) 通信情報
 - (A) 電話番号：
 - (B) ファクシミリ番号：

(2) 配列番号1に関する情報

- (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ：20
 - (B) 種類：核酸
 - (C) 鎖の数：一本鎖
 - (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 分子タイプ：他の核酸 合成DNA
- (xi) 配列の説明：配列番号1

CCGCAACTAC TGACATGACG 20

(2) 配列番号 2 に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 20

(B) 種類 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の説明 : 配列番号 2

AGTAAGCCAT CAAATCTCCC 20

(2) 配列番号 3 に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 1197

(B) 種類 : 核酸

(C) 鎖の数 : 二本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : genomic DNA

(vi) 起源

(A) 生物名 : エシェリヒア・コリ (Escherichia coli)

(B) 株名 : MC1061

配列の特徴 :

特徴を表わす記号 : prim transcript

存在位置 : 248

特徴を決定した方法 : E

配列の特徴 :

特徴を表わす記号 : CDS

存在位置 : 272..1150

特徴を決定した方法 : E

配列の特徴 :

特徴を表わす記号 : primer bind

存在位置 : 27..46

特徴を決定した方法 : E

配列の特徴：

特徴を表わす記号：primer bind

存在位置：1156..1175

特徴を決定した方法：E

配列の特徴：

特徴を表わす記号：RBS

存在位置：261..265

特徴を決定した方法：S

(xi) 配列の説明：配列番号 3

CCAGGCGACT	GTCTTCAATA	TTACAGCCGC	AACTACTGAC	ATGACGGGTG	ATGGTGTTC	60
CAATTCCACG	GCGATCGGCA	CCCAACGCAG	TGATCACCAG	ATAATGTGTT	GCGATGACAG	120
TGTCAAAC	GTGTTCCCTT	TAAGGGGTGA	GTTGTTCTTA	AGGAAAGCAT	AAAAAAAACA	180
TGCATACAAC	AATCAGAACG	GTTCTGTCTG	CTTGCTTTTA	ATGCCATACC	AAACGTACCA	240
TTGAGACACT	TGTTTGACA	GAGGATGGCC	C ATG TTC	ACG GGA	AGT ATT GTC	292
			Met Phe Thr Gly Ser Ile Val			
			1		5	
GCG ATT GTT ACT CCG ATG GAT GAA AAA GGT AAT GTC TGT CGG GCT AGC						340
Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser						
	10	15		20		
TTG AAA AAA CTG ATT GAT TAT CAT GTC GCC AGC GGT ACT TCG GCG ATC						388
Leu Lys Lys Leu Ile Asp Tyr His Val Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile						
	25	30		35		
GTT TCT GTT GGC ACC ACT GGC GAG TCC GCT ACC TTA AAT CAT GAC GAA						436
Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser Ala Thr Leu Asn His Asp Glu						
	40	45		50	55	
CAT GCT GAT GTG GTG ATG ATG ACG CTG GAT CTG GCT GAT GGG CGC ATT						484
His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile						
	60	65		70		
CCG GTA ATT GCC GGG ACC GGC GCT AAC GCT ACT GCG GAA GCC ATT AGC						532
Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser						
	75	80		85		
CTG ACG CAG CGC TTC AAT GAC AGT GGT ATC GTC GGC TGC CTG ACG GTA						580
Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly Ile Val Gly Cys Leu Thr Val						
	90	95		100		
ACC CCT TAC TAC AAT CGT CCG TCG CAA GAA GGT TTG TAT CAG CAT TTC						628
Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe						
	105	110		115		

AAA GCC ATC GCT GAG CAT ACT GAC CTG CCG CAA ATT CTG TAT AAT GTG	676
Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val	
120 125 130 135	
CCG TCC CGT ACT GGC TGC GAT CTG CTC CCG GAA ACG GTG GGC CGT CTG	724
Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu	
140 145 150	
GCG AAA GTA AAA AAT ATT ATC GGA ATC AAA GAG GCA ACA GGG AAC TTA	772
Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu	
155 160 165	
ACG CGT GTA AAC CAG ATC AAA GAG CTG GTT TCA GAT GAT TTT GTT CTG	820
Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu Val Ser Asp Asp Phe Val Leu	
170 175 180	
CTG AGC GGC GAT GAT GCG AGC GCG CTG GAC TTC ATG CAA TTG GGC GGT	868
Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly	
185 190 195	
CAT GGG GTT ATT TCC GTT ACG ACT AAC GTC GCA GCG CGT GAT ATG GCC	916
His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn Val Ala Ala Arg Asp Met Ala	
200 205 210 215	
CAG ATG TGC AAA CTG GCA GCA GAA GAA CAT TTT GCC GAG GCA CGC GTT	964
Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu His Phe Ala Glu Ala Arg Val	
220 225 230	
ATT AAT CAG CGT CTG ATG CCA TTA CAC AAC AAA CTA TTT GTC GAA CCC	1012
Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro	
235 240 245	
AAT CCA ATC CCG GTG AAA TGG GCA TFT AAG GAA CTG GGT CTT GTG GCG	1060
Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala	
250 255 260	
ACC GAT ACG CTG CGC CTG CCA ATG ACA CCA ATC ACC GAC AGT GGT CGT	1108
Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg	
265 270 275	
GAG ACG GTC AGA GCG GCG CTT AAG CAT GCC GGT TTG CTG T AAAGTTTAGG	1158
Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His Ala Gly Leu Leu	
280 285 290	
GAGATTTGAT GGCTTACTCT GTTCAAAAAGT CGCGCCTGG	1197

(2) 配列番号 4 に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 292

(B) 種類 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : ペプチド

(xi) 配列の説明 : 配列番号 4

Met	Phe	Thr	Gly	Ser	Ile	Val	Ala	Ile	Val	Thr	Pro	Met	Asp	Glu	Lys	1	5	10	15
Gly	Asn	Val	Cys	Arg	Ala	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu	Ile	Asp	Tyr	His	Val	20	25	30	
Ala	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ile	Val	Ser	Val	Gly	Thr	Thr	Gly	Glu	Ser	35	40	45	
Ala	Thr	Leu	Asn	His	Asp	Glu	His	Ala	Asp	Val	Val	Met	Met	Thr	Leu	50	55	60	
Asp	Leu	Ala	Asp	Gly	Arg	Ile	Pro	Val	Ile	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	Asn	65	70	75	80
Ala	Thr	Ala	Glu	Ala	Ile	Ser	Leu	Thr	Gln	Arg	Phe	Asn	Asp	Ser	Gly	85	90	95	
Ile	Val	Gly	Cys	Leu	Thr	Val	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Asn	Arg	Pro	Ser	Gln	100	105	110	
Glu	Gly	Leu	Tyr	Gln	His	Phe	Lys	Ala	Ile	Ala	Glu	His	Thr	Asp	Leu	115	120	125	
Pro	Gln	Ile	Leu	Tyr	Asn	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Gly	Cys	Asp	Leu	Leu	130	135	140	
Pro	Glu	Thr	Val	Gly	Arg	Leu	Ala	Lys	Val	Lys	Asn	Ile	Ile	Gly	Ile	145	150	155	160
Lys	Glu	Ala	Thr	Gly	Asn	Leu	Thr	Arg	Val	Asn	Gln	Ile	Lys	Glu	Leu	165	170	175	
Val	Ser	Asp	Asp	Phe	Val	Leu	Leu	Ser	Gly	Asp	Asp	Ala	Ser	Ala	Leu	180	185	190	
Asp	Phe	Met	Gln	Leu	Gly	Gly	His	Gly	Val	Ile	Ser	Val	Thr	Thr	Asn	195	200	205	
Val	Ala	Ala	Arg	Asp	Met	Ala	Gln	Met	Cys	Lys	Leu	Ala	Ala	Glu	Glu	210	215	220	
His	Phe	Ala	Glu	Ala	Arg	Val	Ile	Asn	Gln	Arg	Leu	Met	Pro	Leu	His	225	230	235	240

- 68 -

Asn	Lys	Leu	Phe	Val	Glu	Pro	Asn	Pro	Ile	Pro	Val	Lys	Trp	Ala	Cys
				245					250					255	
Lys	Glu	Leu	Gly	Leu	Val	Ala	Thr	Asp	Thr	Leu	Arg	Leu	Pro	Met	Thr
			260					265					270		
Pro	Ile	Thr	Asp	Ser	Gly	Arg	Glu	Thr	Val	Arg	Ala	Ala	Leu	Lys	His
			275				280					285			
Ala	Gly	Leu	Leu												
			290												

(2) 配列番号 5 に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 20
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の説明 : 配列番号 5

CTTCCCTTGT GCCAAGGCTG 20

(2) 配列番号 6 に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 18
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の説明 : 配列番号 6

GAATTCCTTT GCGAGCAG 18

(2) 配列番号 7 に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 2147
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 二本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : genomic DNA

(vi) 起源

(A) 生物名 : エシェリヒア・コリ (Escherichia coli)

(B) 株名 : MC1061

配列の特徴 :

特徴を表わす記号 : -35 signal

存在位置 : 242..249

特徴を決定した方法 : S

配列の特徴 :

特徴を表わす記号 : -10 signal

存在位置 : 265..273

特徴を決定した方法 : S

配列の特徴 :

特徴を表わす記号 : primer bind

存在位置 : 536..555

特徴を決定した方法 : E

配列の特徴 :

特徴を表わす記号 : primer bind

存在位置 : 2128..2147

特徴を決定した方法 : E

配列の特徴 :

特徴を表わす記号 : RBS

存在位置 : 575..578

特徴を決定した方法 : S

配列の特徴 :

特徴を表わす記号 : CDS

存在位置 : 584..1933

特徴を決定した方法 : S

配列の特徴 :

特徴を表わす記号 : terminator

存在位置 : 1941..1968

特徴を決定した方法 : S

(xi) 配列の説明 : 配列番号 7

配列

TCGAAGTGTT TCTGTAGTGC CTGCCAGGCA GCGGTCTGCG TTGGATTGAT GTTTTTCATT 60
 AGCAATACTC TTCTGATTTT GAGAATTGTG ACTTTGGAAG ATTGTAGCGC CAGTCACAGA 120
 AAAATGTGAT GGTTTTAGTG CCGTTAGCGT AATGTTGAGT GTAAACCCCT AGCGCAGTGA 180
 AGCATTTATT AGCTGAACTA CTGACCGCCA GGAGTGGATG AAAAATCCGC ATGACCCCAT 240
 CGTTGACAAC CGCCCCGCTC ACCCTTTATT TATAAATGTA CTACCTGCGC TAGCGCAGGC 300
 CAGAAGAGGC GCGTTGCCCA AGTAACGGTG TTGGAGGAGC CAGTCCTGTG ATAACACCTG 360
 AGGGGGTGCA TCGCCGAGGT GATTGAACGG CTGGCCACGT TCATCATCGG CTAAGGGGGC 420
 TGAATCCCCT GGGTTGTCAC CAGAAGCGTT CGCAGTCGGG CGTTTCGCAA GTGGTGGAGC 480
 ACTTCTGGGT GAAAATAGTA GCGAAGTATC GCTCTGCGCC CACCCGTCTT CCGCTCTTCC 540
 CTTGTGCCAA GGCTGAAAAT GGATCCCCTG ACACGAGGTA GTT ATG TCT GAA ATT 595

Met Ser Glu Ile

1

GTT GTC TCC AAA TTT GGC GGT ACC AGC GTA GCT GAT TTT GAC GCC ATG 643
 Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp Phe Asp Ala Met

5

10

15

20

AAC CGC AGC GCT GAT ATT GTG CTT TCT GAT GCC AAC GTG CGT TTA GTT 691
 Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn Val Arg Leu Val

25

30

35

GTC CTC TCG GCT TCT GCT GGT ATC ACT AAT CTG CTG GTC GCT TTA GCT 739
 Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu Val Ala Leu Ala

40

45

50

GAA GGA CTG GAA CCT GGC GAG CGA TTC GAA AAA CTC GAC GCT ATC CGC 787
 Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu Asp Ala Ile Arg

55

60

65

AAC ATC CAG TTT GCC ATT CTG GAA CGT CTG CGT TAC CCG AAC GTT ATC 835
 Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr Pro Asn Val Ile

70

75

80

CGT GAA GAG ATT GAA CGT CTG CTG GAG AAC ATT ACT GTT CTG GCA GAA 883
 Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr Val Leu Ala Glu

85

90

95

100

GCG GCG GCG CTG GCA ACG TCT CCG GCG CTG ACA GAT GAG CTG GTC AGC 931
 Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp Glu Leu Val Ser

105

110

115

CAC GGC GAG CTG ATG TCG ACC CTG CTG TTT GTT GAG ATC CTG CGC GAA	979
His Gly Glu Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu Ile Leu Arg Glu	
120 125 130	
CGC GAT GTT CAG GCA CAG TGG TTT GAT GTA CGT AAA GTG ATG CGT ACC	1027
Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys Val Met Arg Thr	
135 140 145	
AAC GAC CGA TTT GGT CGT GCA GAG CCA GAT ATA GCC GCG CTG GCG GAA	1075
Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala Ala Leu Ala Glu	
150 155 160	
CTG GCC GCG CTG CAG CTG CTC CCA CGT CTC AAT GAA GGC TTA GTG ATC	1123
Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu Gly Leu Val Ile	
165 170 175 180	
ACC CAG GGA TTT ATC GGT AGC GAA AAT AAA GGT CGT ACA ACG ACG CTT	1171
Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg Thr Thr Thr Leu	
185 190 195	
GGC CGT GGA GGC AGC GAT TAT ACG GCA GCC TTG CTG GCG GAG GCT TTA	1219
Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ala Leu	
200 205 210	
CAC GCA TCT CGT GTT GAT ATC TGG ACC GAC GTC CCG GGC ATC TAC ACC	1267
His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro Gly Ile Tyr Thr	
215 220 225	
ACC GAT CCA CGC GTA GTT TCC GCA GCA AAA CGC ATT GAT GAA ATC GCG	1315
Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile Asp Glu Ile Ala	
230 235 240	
TTT GCC GAA GCG GCA GAG ATG GCA ACT TTT GGT GCA AAA GTA CTG CAT	1363
Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala Lys Val Leu His	
245 250 255 260	
CCG GCA ACG TTG CTA CCC GCA GTA CGC AGC GAT ATC CCG GTC TTT GTC	1411
Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile Pro Val Phe Val	
265 270 275	
GGC TCC AGC AAA GAC CCA CGC GCA GGT GGT ACG CTG GTG TGC AAT AAA	1459
Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu Val Cys Asn Lys	
280 285 290	
ACT GAA AAT CCG CCG CTG TTC CGC GCT CTG GCG CTT CGT CGC AAT CAG	1507
Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu Arg Arg Asn Gln	
295 300 305	

ACT CTG CTC ACT TTG CAC AGC CTG AAT ATG CTG CAT TCT CGC GGT TTC	1555
Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His Ser Arg Gly Phe	
310 315 320	
CTC GCG GAA GTT TTC GGC ATC CTC GCG CGG CAT AAT ATT TCG GTA GAC	1603
Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn Ile Ser Val Asp	
325 330 335 340	
TTA ATC ACC ACG TCA GAA GTG AGC GTG GCA TTA ACC CTT GAT ACC ACC	1651
Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr Leu Asp Thr Thr	
345 350 355	
GGT TCA ACC TCC ACT GGC GAT ACG TTG CTG ACG CAA TCT CTG CTG ATG	1699
Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln Ser Leu Leu Met	
360 365 370	
GAG CTT TCC GCA CTG TGT CGG GTG GAG GTG GAA GAA GGT CTG GCG CTG	1747
Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu Gly Leu Ala Leu	
375 380 385	
GTC GCG TTG ATT GGC AAT GAC CTG TCA AAA GCC TGC GGC GTT GGC AAA	1795
Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys Gly Val Gly Lys	
390 395 400	
GAG GTA TTC GGC GTA CTG GAA CCG TTC AAC ATT CGC ATG ATT TGT TAT	1843
Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg Met Ile Cys Tyr	
405 410 415 420	
GGC GCA TCC AGC CAT AAC CTG TGC TTC CTG GTG CCC GGC GAA GAT GCC	1891
Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro Gly Glu Asp Ala	
425 430 435	
GAG CAG GTG GTG CAA AAA CTG CAT AGT AAT TTG TTT GAG TAAATACTGT	1940
Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe Glu	
440 445	
ATGGCCTGGA AGCTATATTT CGGGCCGTAT TGATTTTCTT GTCATATGC TCATCAATAA	2000
ACGAGCCTGT ACTCTGTAA CCAGCGTCTT TATCGGAGAA TAATTGCCTT TAATTTTTTT	2060
ATCTGCATCT CTAATTAATT ATCGAAAGAG ATAAATAGTT AAGAGAAGGC AAAATGAATA	2120
TTATCAGTTC TGCTCGCAAA GGAATTC	2147

(2) 配列番号 8 に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ : 449

(B) 種類 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : ペプチド

- 73 -

(xi) 配列の説明：配列番号 8

Met	Ser	Glu	Ile	Val	Val	Ser	Lys	Phe	Gly	Gly	Thr	Ser	Val	Ala	Asp
1				5					10					15	
Phe	Asp	Ala	Met	Asn	Arg	Ser	Ala	Asp	Ile	Val	Leu	Ser	Asp	Ala	Asn
			20					25					30		
Val	Arg	Leu	Val	Val	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Gly	Ile	Thr	Asn	Leu	Leu
		35					40					45			
Val	Ala	Leu	Ala	Glu	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Glu	Arg	Phe	Glu	Lys	Leu
	50					55					60				
Asp	Ala	Ile	Arg	Asn	Ile	Gln	Phe	Ala	Ile	Leu	Glu	Arg	Leu	Arg	Tyr
65				70					75					80	
Pro	Asn	Val	Ile	Arg	Glu	Glu	Ile	Glu	Arg	Leu	Leu	Glu	Asn	Ile	Thr
				85					90					95	
Val	Leu	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Thr	Ser	Pro	Ala	Leu	Thr	Asp
		100					105					110			
Glu	Leu	Val	Ser	His	Gly	Glu	Leu	Met	Ser	Thr	Leu	Leu	Phe	Val	Glu
	115					120					125				
Ile	Leu	Arg	Glu	Arg	Asp	Val	Gln	Ala	Gln	Trp	Phe	Asp	Val	Arg	Lys
130						135				140					
Val	Met	Arg	Thr	Asn	Asp	Arg	Phe	Gly	Arg	Ala	Glu	Pro	Asp	Ile	Ala
145				150					155					160	
Ala	Leu	Ala	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Gln	Leu	Leu	Pro	Arg	Leu	Asn	Glu
			165					170					175		
Gly	Leu	Val	Ile	Thr	Gln	Gly	Phe	Ile	Gly	Ser	Glu	Asn	Lys	Gly	Arg
	180					185						190			
Thr	Thr	Thr	Leu	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Tyr	Thr	Ala	Ala	Leu	Leu
	195					200					205				
Ala	Glu	Ala	Leu	His	Ala	Ser	Arg	Val	Asp	Ile	Trp	Thr	Asp	Val	Pro
210				215					220						
Gly	Ile	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Ala	Lys	Arg	Ile
225				230					235				240		
Asp	Glu	Ile	Ala	Phe	Ala	Glu	Ala	Ala	Glu	Met	Ala	Thr	Phe	Gly	Ala
			245					250					255		
Lys	Val	Leu	His	Pro	Ala	Thr	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Arg	Ser	Asp	Ile
	260					265						270			
Pro	Val	Phe	Val	Gly	Ser	Ser	Lys	Asp	Pro	Arg	Ala	Gly	Gly	Thr	Leu
	275					280						285			

Val Cys Asn Lys Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu
 290 295 300
 Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His
 305 310 315 320
 Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn
 325 330 335
 Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr
 340 345 350
 Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln
 355 360 365
 Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu
 370 375 380
 Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
 385 390 395 400
 Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
 405 410 415
 Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430
 Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445
 Glu

(2) 配列番号 9 に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 20
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子タイプ : 他の核酸 合成 DNA

(xi) 配列の説明 : 配列番号 9

CTTCACTGA TATCCCTCCC 20

(2) 配列番号 10 に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 20
- (B) 種類 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii)分子タイプ：他の核酸 合成DNA

(xi)配列の説明：配列番号10

AAAAAGTGGG CCAAATGGTC 20

(2) 配列番号11に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：20

(B) 種類：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii)分子タイプ：他の核酸 合成DNA

(xi)配列の説明：配列番号11

CATCTAAGTA TGCATCTCGG 20

(2) 配列番号12に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：20

(B) 種類：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii)分子タイプ：他の核酸 合成DNA

(xi)配列の説明：配列番号12

TGCCCCCTCGA GCTAAATTAG 20

(2) 配列番号13に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：20

(B) 種類：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii)分子タイプ：他の核酸 合成DNA

(xi)配列の説明：配列番号13

TGCACGGTAG GATGTAATCG 20

(2) 配列番号14に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：20

(B) 種類：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子タイプ：他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の説明：配列番号14

TTAATGAAAC AAATGCCCGG 20

(2) 配列番号15に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：20

(B) 種類：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子タイプ：他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の説明：配列番号15

TTTATTCATA ATTGCCACCG 20

(2) 配列番号16に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：20

(B) 種類：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子タイプ：他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の説明：配列番号16

CACGGTAATA CATATAACCG 20

(2) 配列番号17に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：20

(B) 種類：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子タイプ：他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の説明：配列番号17

CCTGCAATTG TCAAACGTCC 20

(2) 配列番号18に関する情報

(i) 配列の特徴

- 77 -

(A) 長さ: 20

(B) 種類: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子タイプ: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の説明: 配列番号18

GTCGACGCGC TTGAGATCTT 20

(2) 配列番号19に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 20

(B) 種類: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子タイプ: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の説明: 配列番号19

TCATAAAGAG TCGCTAAACG 20

(2) 配列番号20に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 20

(B) 種類: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子タイプ: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の説明: 配列番号20

CAACCGCCCG GTCATCAAGC 20

請求の範囲

1. L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するエシェリヒア属細菌由来のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNA。
2. L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異が、配列表の配列番号3に記載されるジヒドロジピコリン酸合成酵素のアミノ酸配列中、N-末端から81番目のアラニン残基をバリン残基に置換させる変異、118番目のヒスチジン残基をチロシン残基に置換させる変異、81番目のアラニン残基をバリン残基に置換させかつ118番目のヒスチジン残基をチロシン残基に置換させる変異よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項1記載のDNA。
3. L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するエシェリヒア属細菌由来のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAが細胞内に導入されて形質転換されたエシェリヒア属細菌。
4. L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異が、配列表の配列番号4に記載されるジヒドロジピコリン酸合成酵素のアミノ酸配列中、N-末端から81番目のアラニン残基をバリン残基に置換させる変異、118番目のヒスチジン残基をチロシン残基に置換させる変異、81番目のアラニン残基をバリン残基に置換させかつ118番目のヒスチジン残基をチロシン残基に置換させる変異よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項3記載のエシェリヒア属細菌。
5. さらに、L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼを保持することを特徴とする請求項3記載のエシェリヒア属細菌。
6. L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するエシェリヒア属細菌由来のアスパルトキナーゼIIIをコードするDNAが細胞内に導入されたことにより、L-リジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼを保持することを特徴とする請求項5記載のエシェリヒア属細菌。

7. アスパルトキナーゼIIIのL-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異が、配列表の配列番号8に記載されるアスパルトキナーゼIIIのアミノ酸配列中、N-末端から323番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、323番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させかつ408番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、34番目のアルギニン残基をシステイン残基に置換させかつ323番目のグリシン残基をアスパラギン酸残基に置換させる変異、325番目のロイシン残基をフェニルアラニン残基に置換させる変異、318番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させる変異、318番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ349番目のバリン残基をメチオニン残基に置換させる変異、345番目のセリン残基をロイシン残基に置換させる変異、347番目のバリン残基をメチオニン残基に置換させる変異、352番目のスレオニン残基をイソロイシン残基に置換させる変異、352番目のスレオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ369番目のセリン残基をフェニルアラニン残基に置換させる変異、164番目のグルタミン酸残基をリジン残基に置換させる変異、417番目のメチオニン残基をイソロイシン残基に置換させかつ419番目のシステイン残基をチロシン残基に置換させる変異、よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項6記載のエシェリヒア属細菌。

8. ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子が増強された請求項5記載のエシェリヒア属細菌。

9. ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子がエシェリヒア属細菌細胞内で自律複製可能なベクターに連結されてなる組換えDNAで形質転換された請求項8記載のエシェリヒア属細菌。

10. 増強されたコリネ型細菌由来のジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が導入された請求項8記載のエシェリヒア属細菌。

11. コリネ型細菌由来のジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子がエシェリヒア属細菌細胞内で自律複製可能なベクターに連結されてなる組換えDNA

で形質転換された請求項 10 記載のエシェリヒア属細菌

12. スクシニルジアミノピメリン酸トランスアミナーゼ遺伝子及びスクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼ遺伝子が増強された請求項 8 記載のエシェリヒア属細菌。

13. スクシニルジアミノピメリン酸トランスアミナーゼ遺伝子及びスクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼ遺伝子がエシェリヒア属細菌細胞内で自律複製可能な同一又は異なるベクターに連結されてなる単一の組換え DNA、又は 2 つの組換え DNA で形質転換された請求項 12 記載のエシェリヒア属細菌。

14. 請求項 3～13 のいずれか一項に記載のエシェリヒア属細菌を好適な培地で培養し、該培養物中に L-リジンを生産蓄積せしめ、該培養物から L-リジンを採取することを特徴とする L-リジンの製造法。

1 / 18

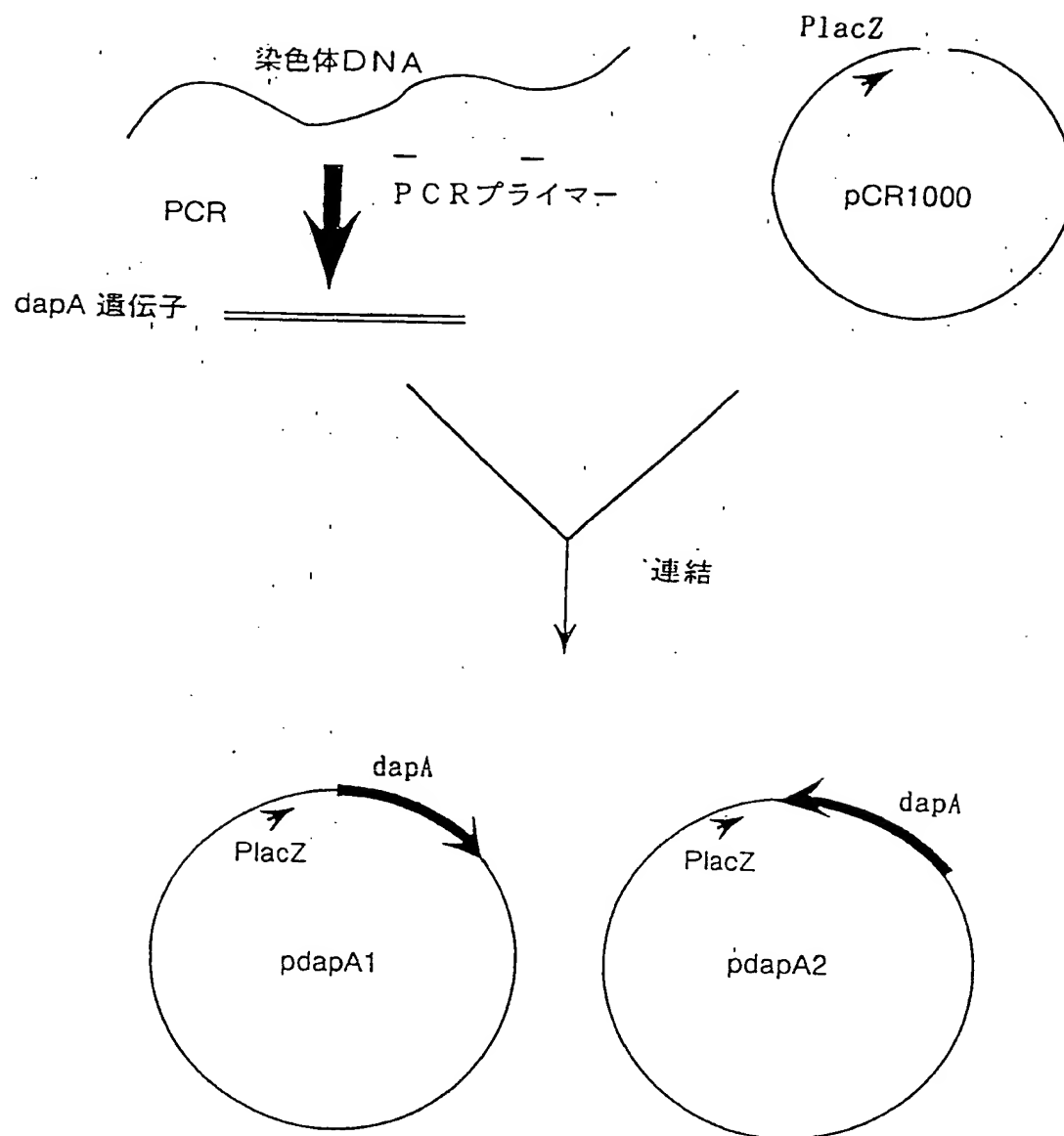


Fig. 1

2 / 18

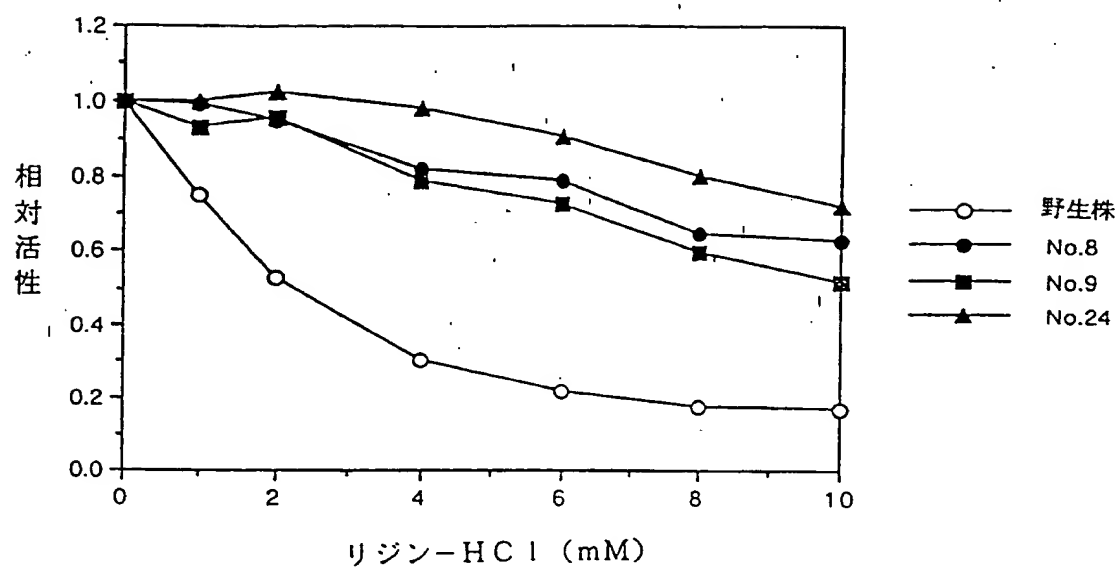


Fig. 2

3 / 18

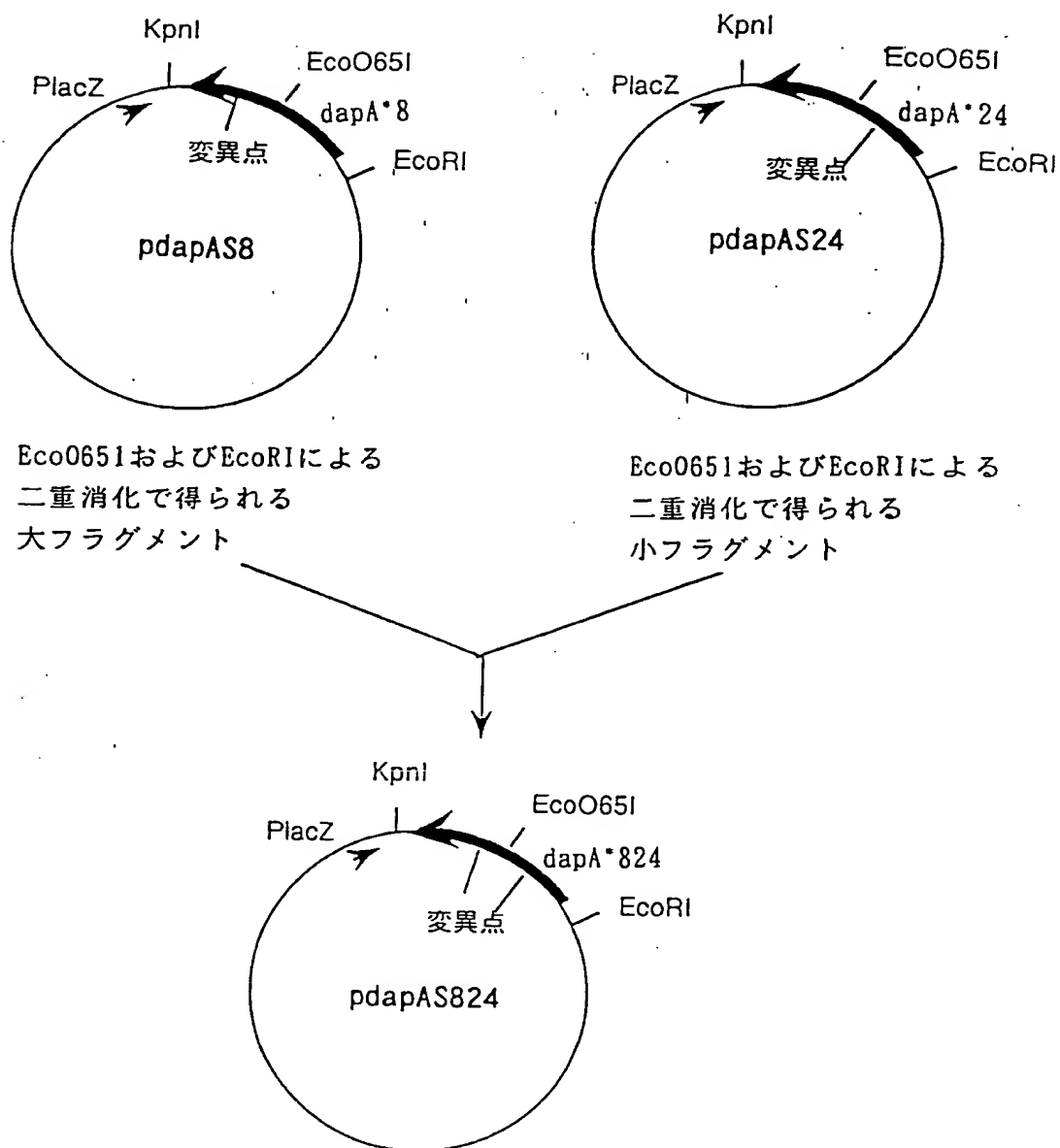


Fig. 3

4 / 18

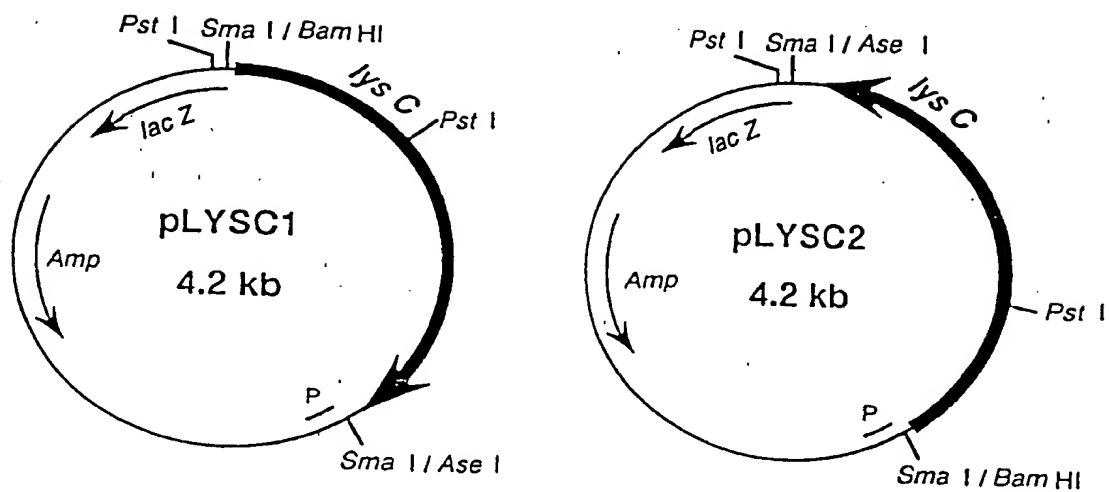


Fig. 4

5 / 18

ヒドロキシルアミンによる変異導入

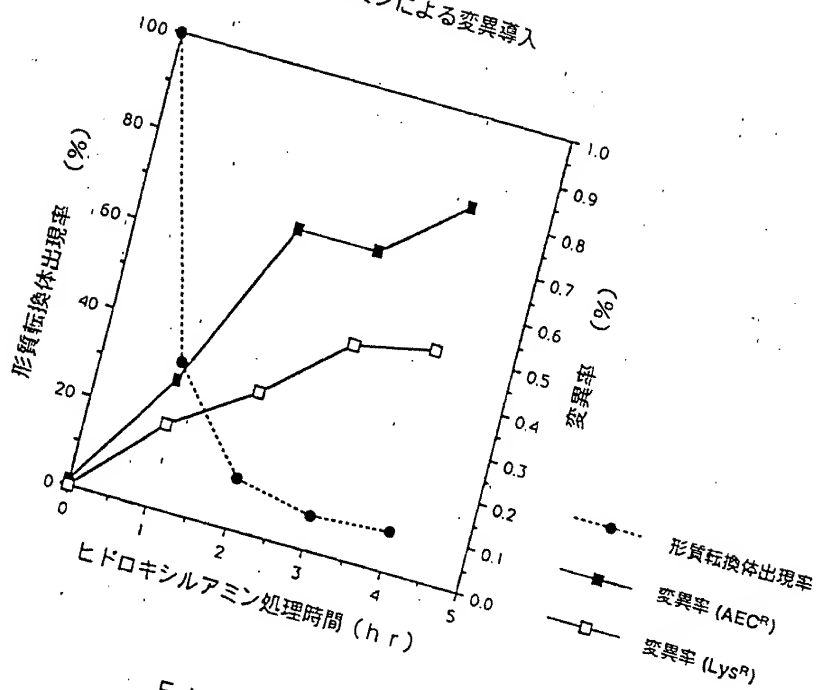


Fig. 5

. 6 / 18

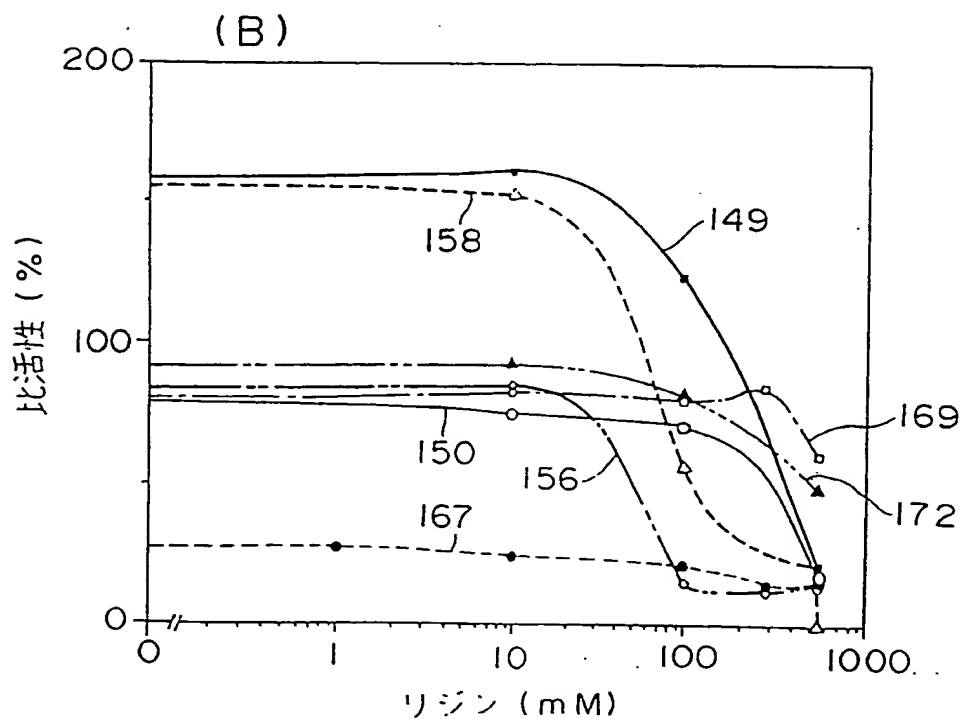
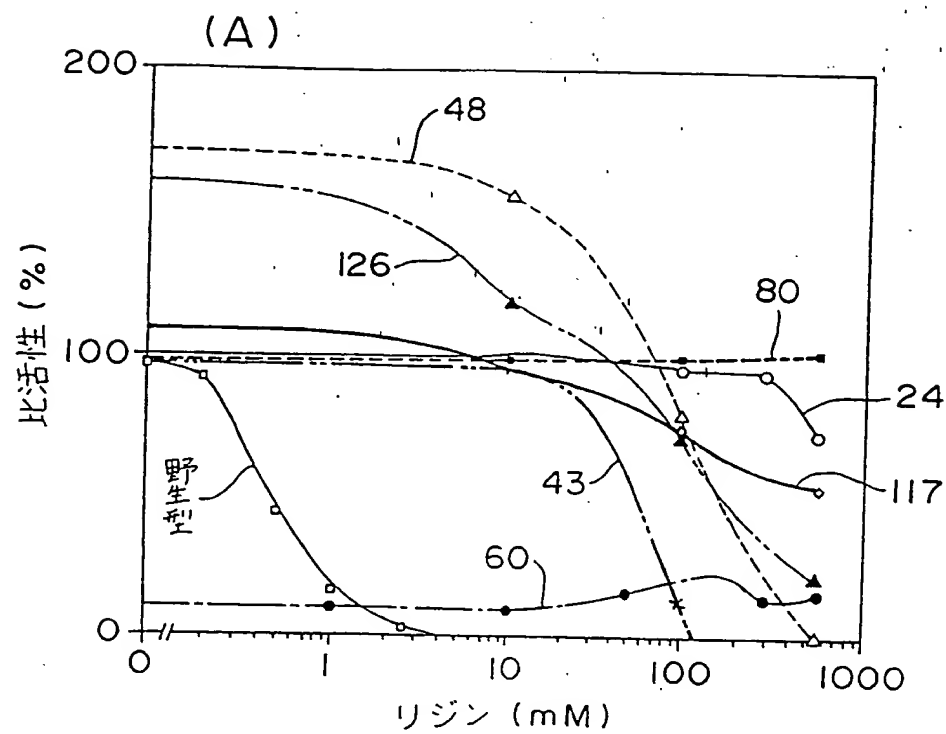


Fig. 6

7 / 18

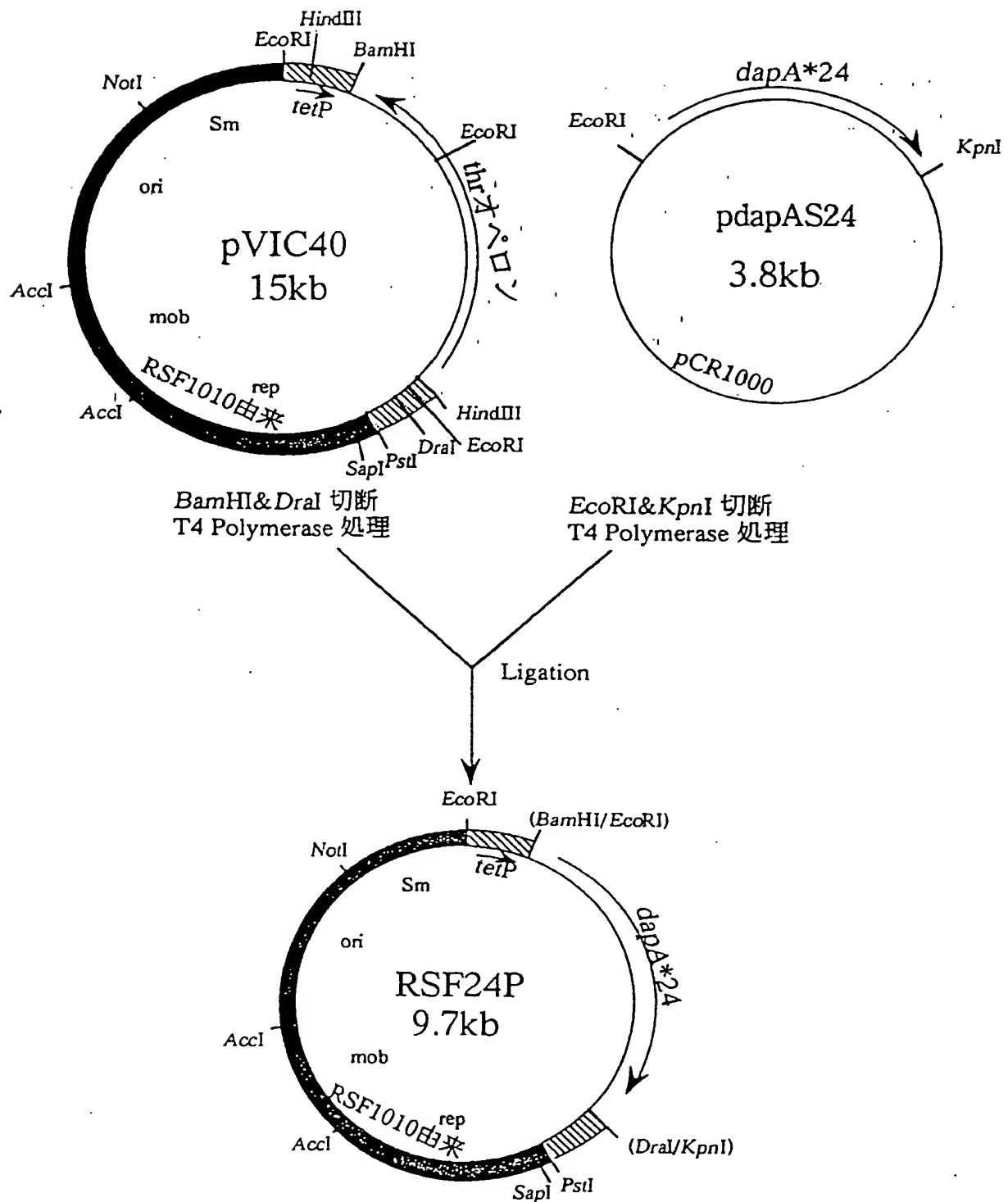


Fig. 7

8 / 18

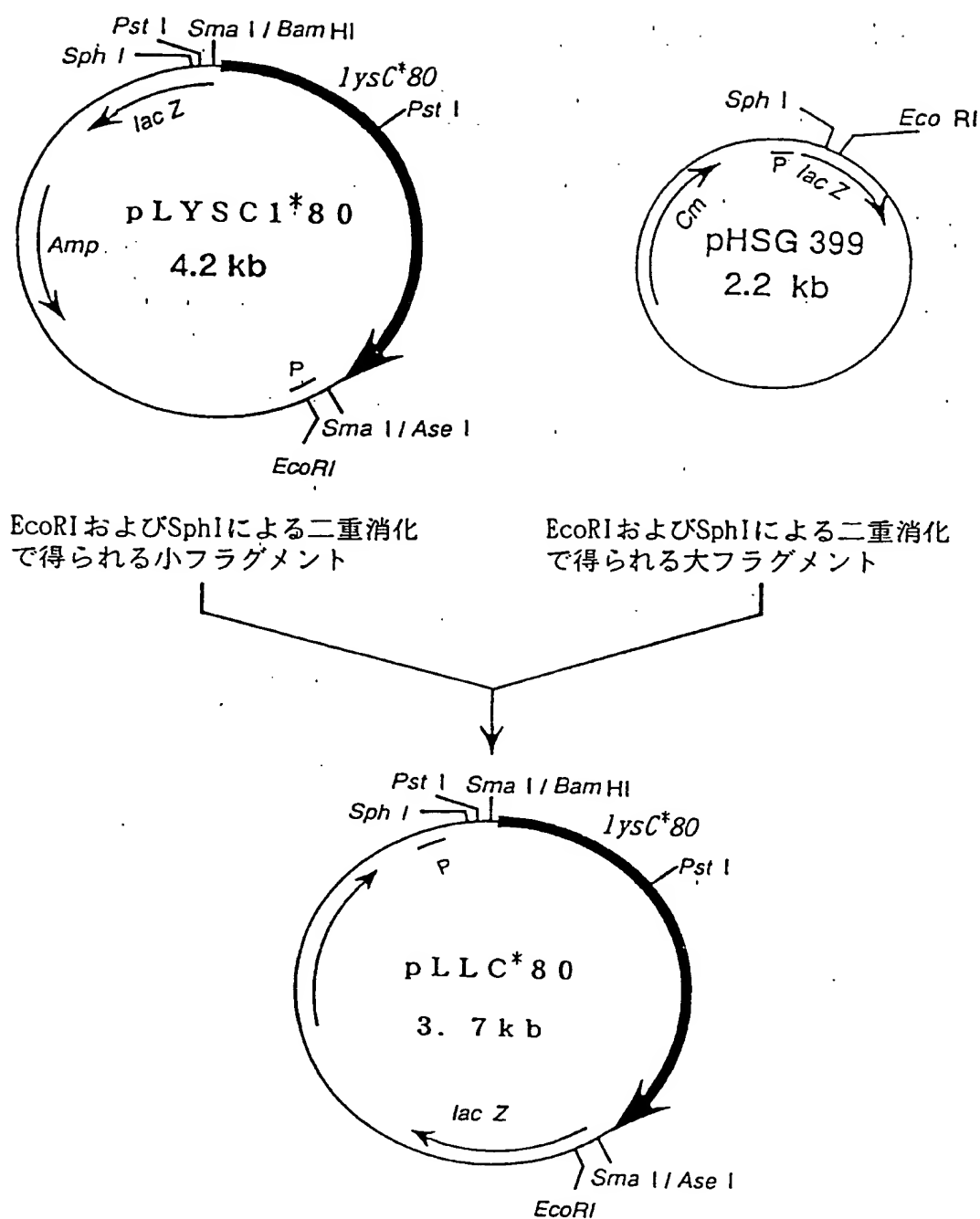


Fig. 8

9 / 18

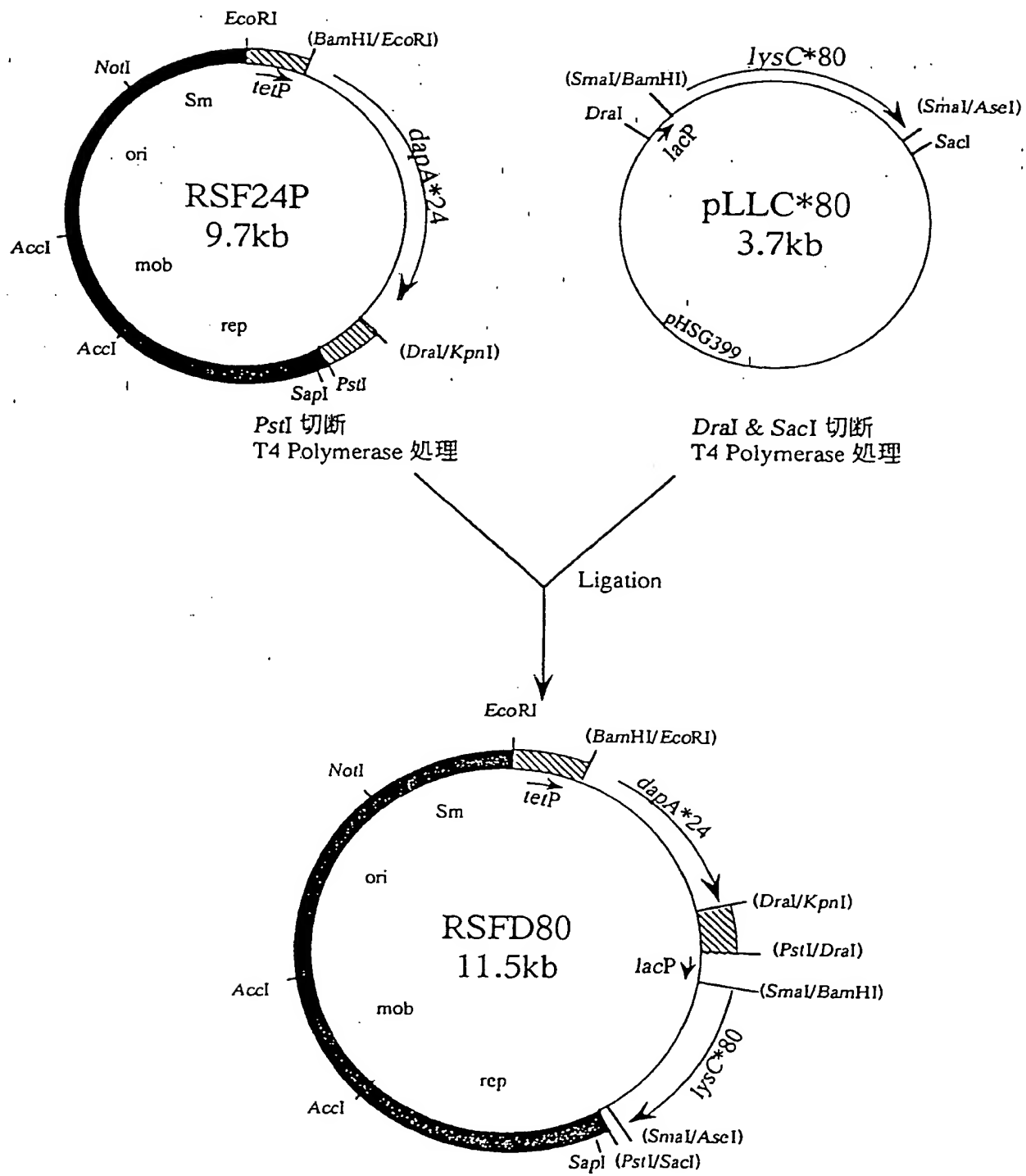


Fig. 9

10/18

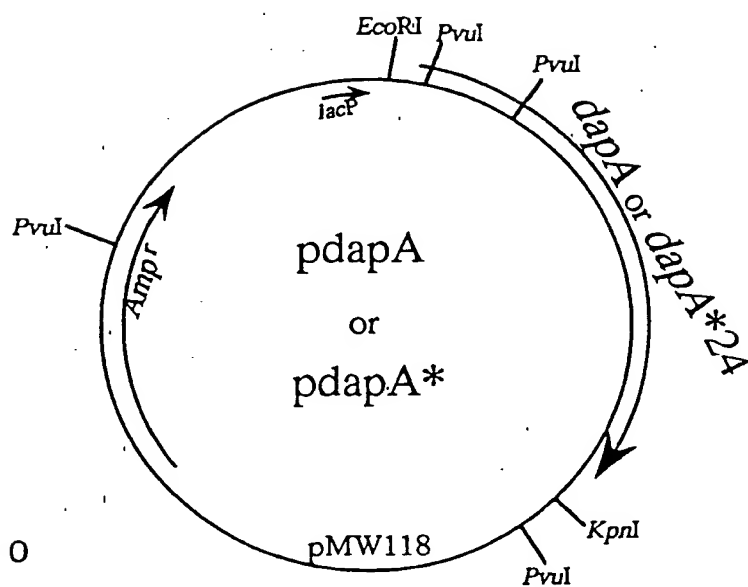


Fig. 10

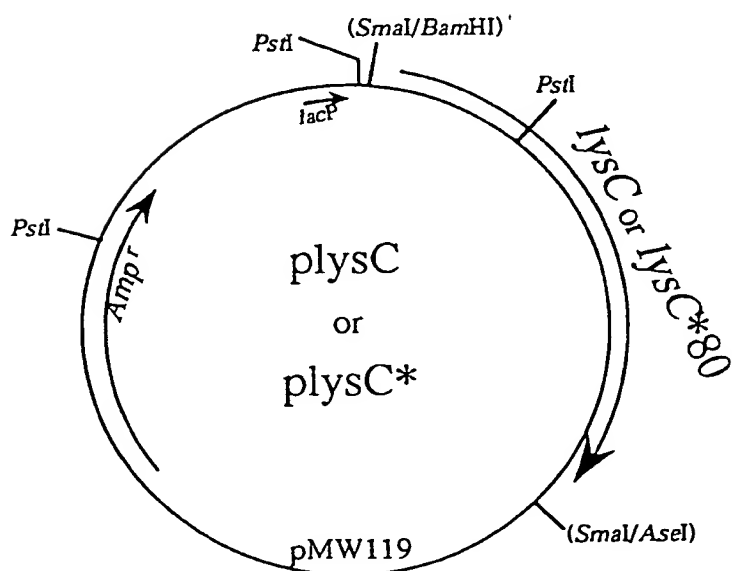
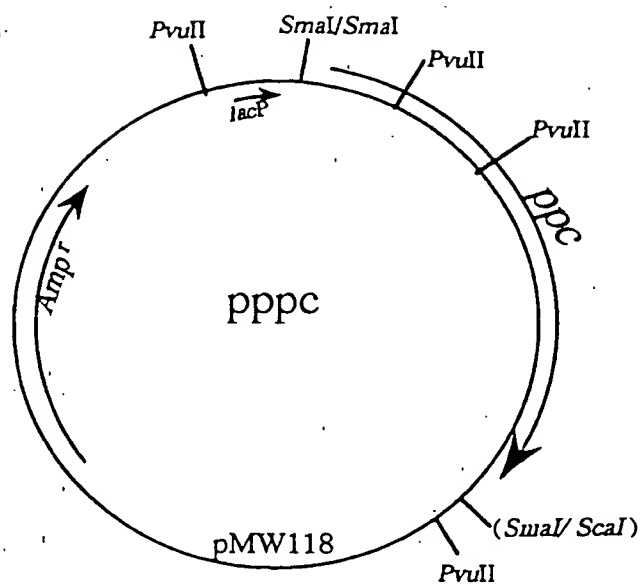
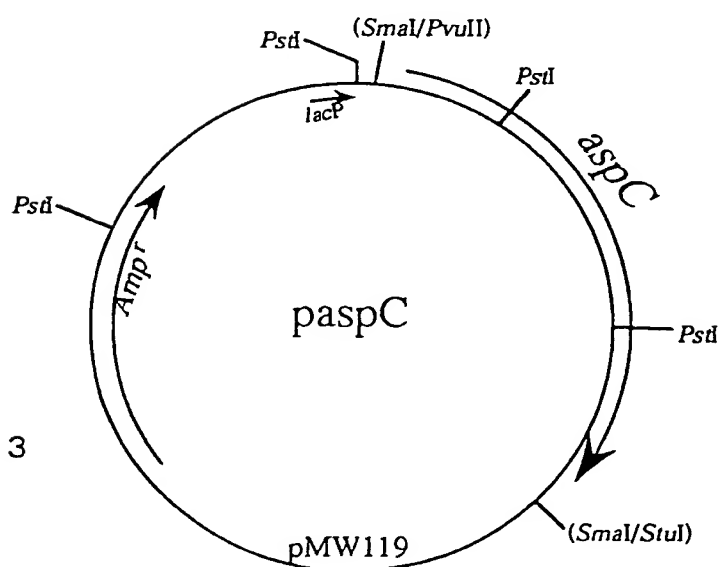


Fig. 11

11 / 18



F i g . 1 2



F i g . 1 3

12 / 18

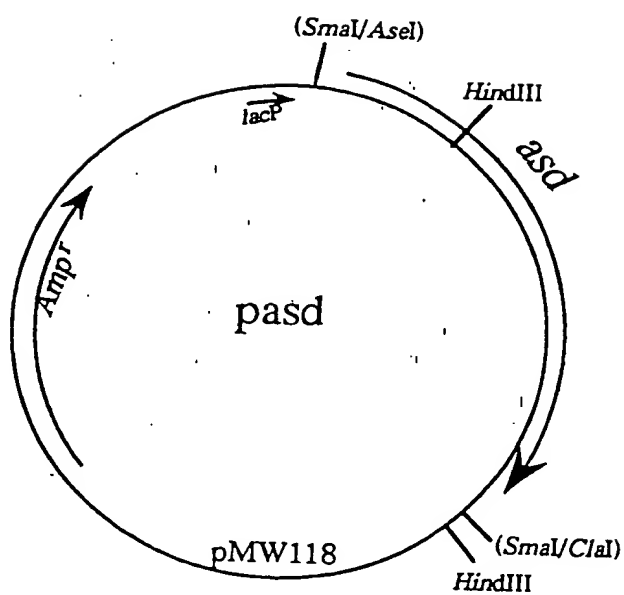


Fig. 14

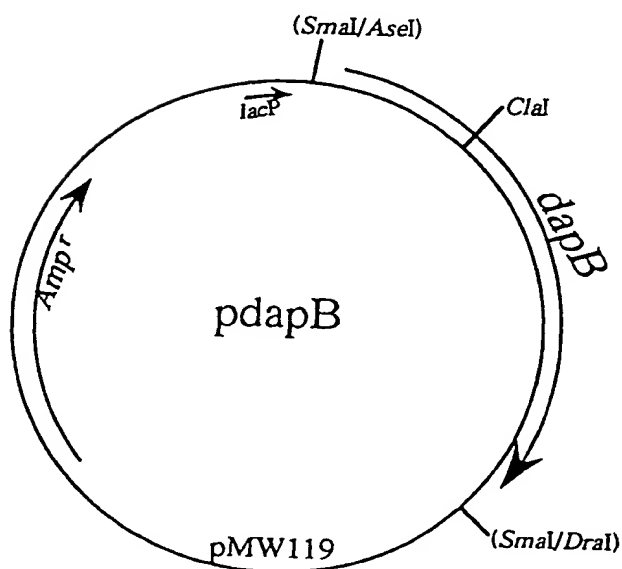


Fig. 15

13 / 18

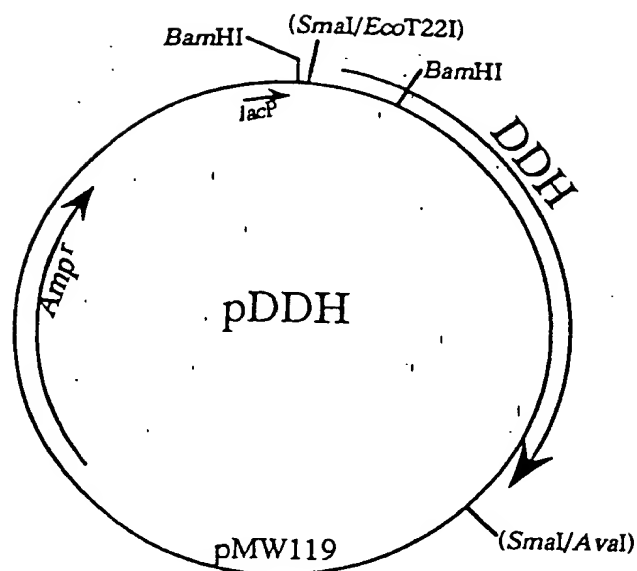


Fig. 16

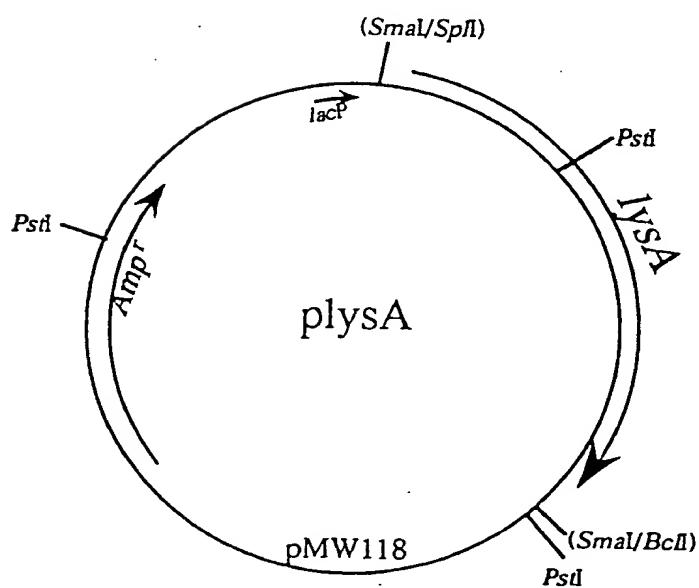


Fig. 17

15 / 18

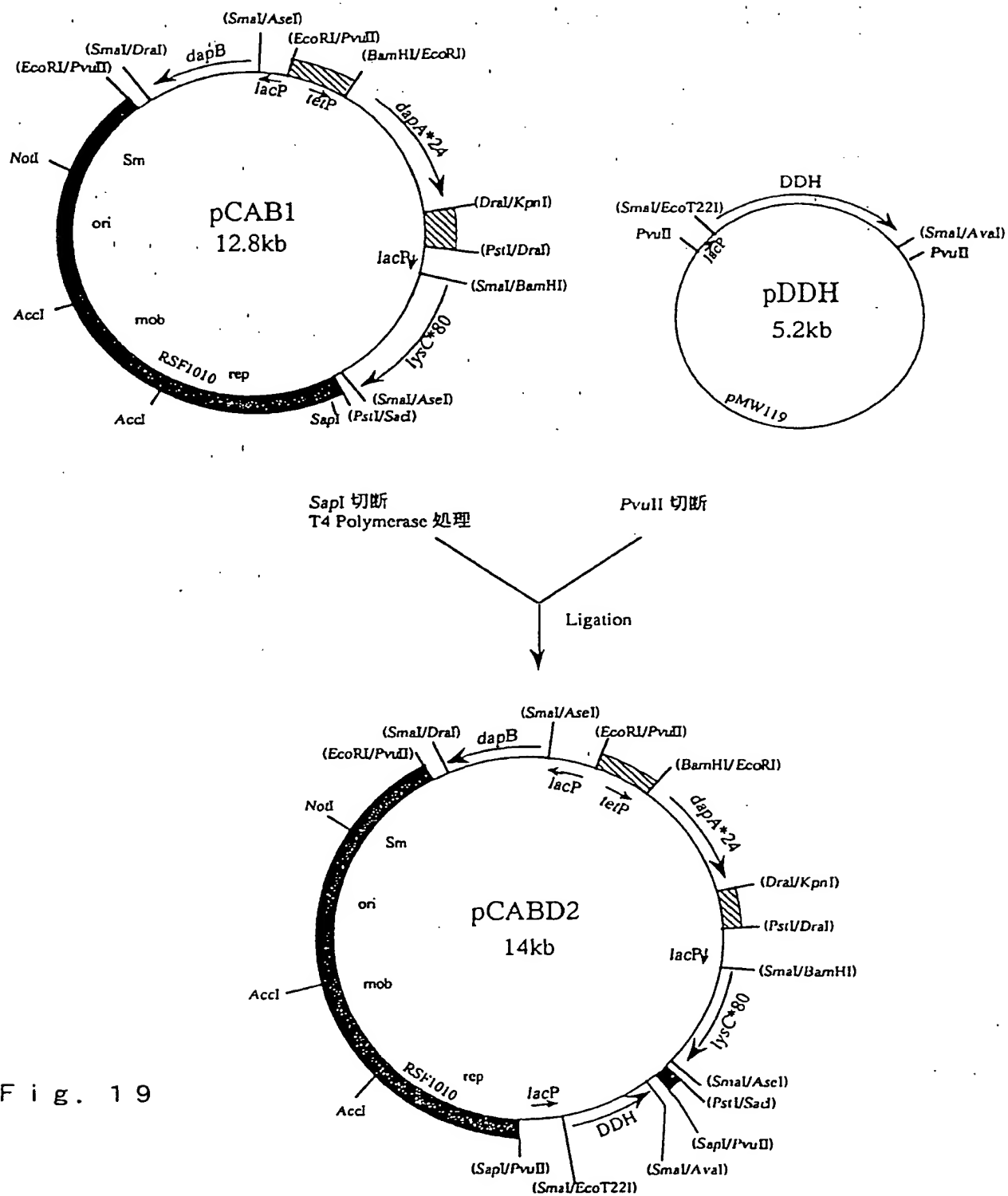


Fig. 19

16 / 18

Fig. 20

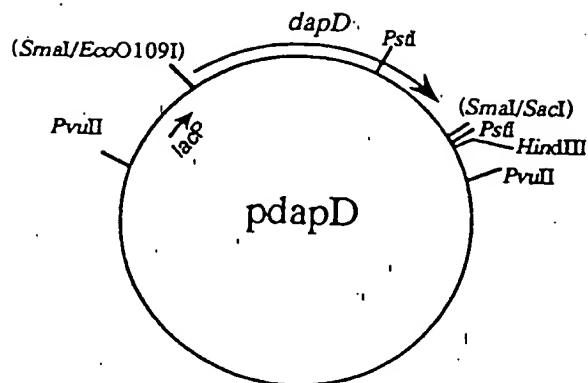


Fig. 21

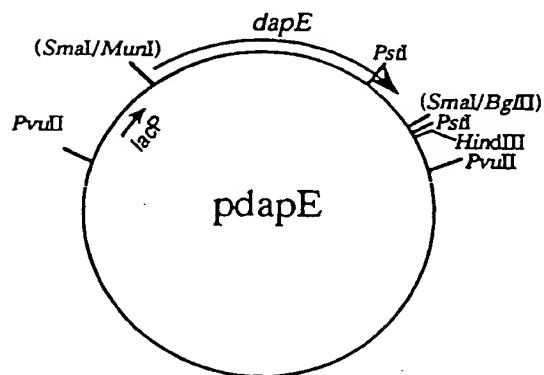
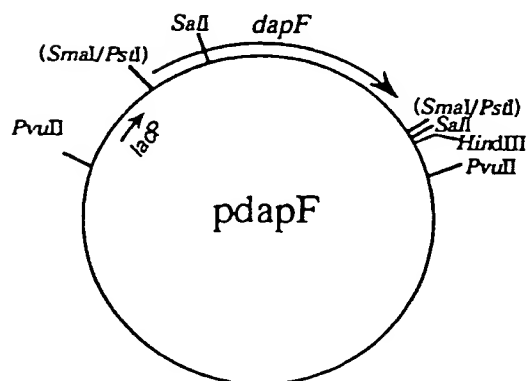


Fig. 22



17 / 18

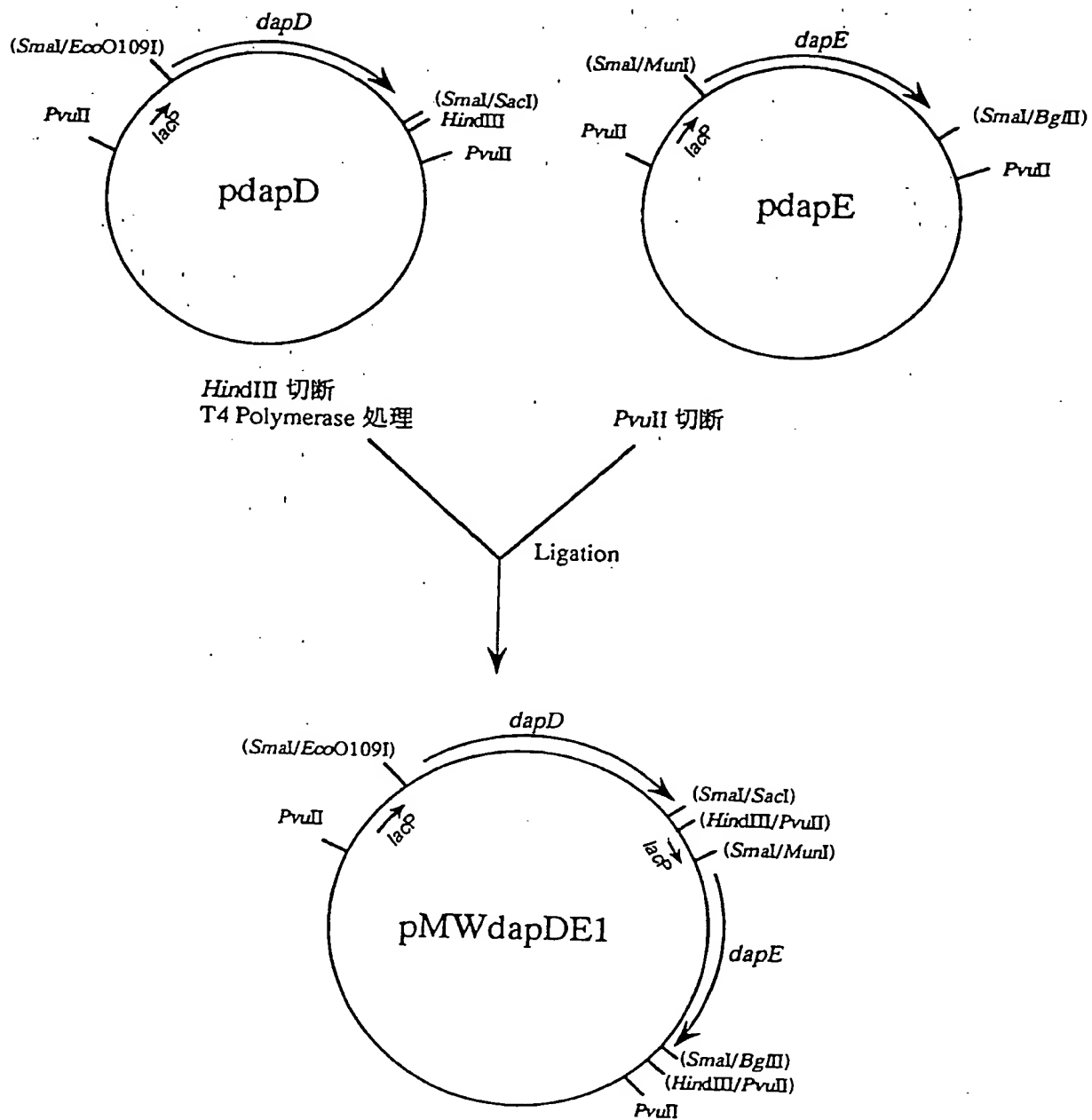


Fig. 23

18 / 18

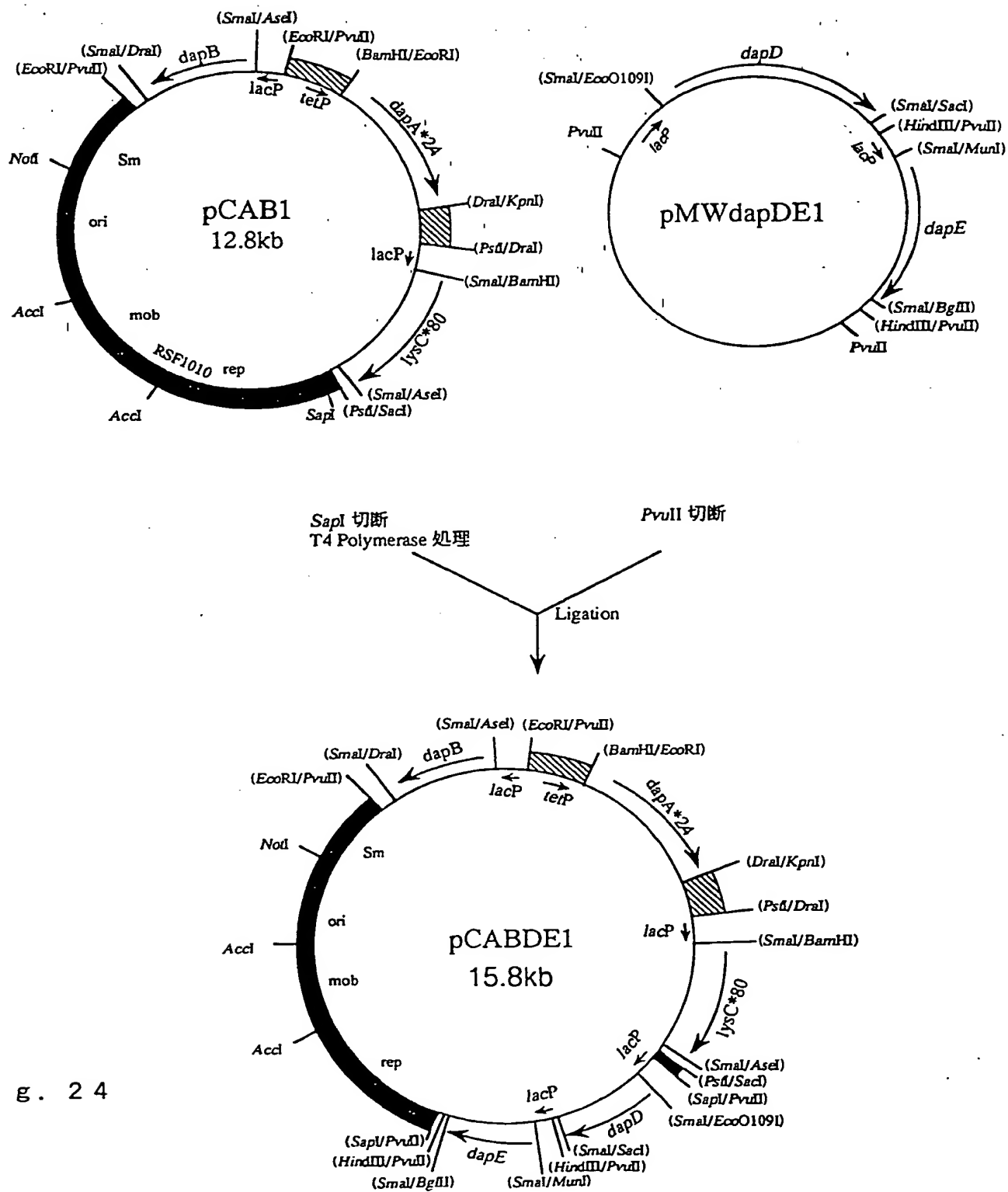


Fig. 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01994

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. C1 ⁶ C12N15/54, C12N1/21, C12P13/06 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. C1 ⁶ C12N15/54, C12N1/21, C12P13/06, C12N9/10, C12N9/12 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ONLINE, WPI/WPIL, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, A, 485970 (Yeda Research and Development Co. Ltd.), May 20, 1992 (20. 05. 92) & US, A, 5367110	5-14
A	WO, A, 9319190 (Du Pont de Nemours & Co E I) September 30, 1993 (30. 09. 93) & AU, A, 9339233	5-14
A	J. Bacteriol Vol. 166, No. 1 (1986) Richard Francois et al. "Chromosomal location and nucleotide sequence of the Escherichia coli dapA gene" p. 297-300	1-14
PA	WO, A, 9411517 (Ajinomoto Co., Inc.), May 26, 1994 (26. 05. 94) (Family: none)	5-14
X/Y	EP, A, 435132 (FORSCHUNGSZENT JUELICH GMBH), July 3, 1991 (03. 07. 91) & DE, A, 3943117	1/2-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search January 25, 1995 (25. 01. 95)		Date of mailing of the international search report February 14, 1995 (14. 02. 95)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/54, C12N1/21, C12P13/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/54, C12N1/21, C12P13/06,
C12N9/10, C12N9/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, WPI/WPIL, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP, A, 485970 (Yeda Research and Development Co. Ltd.); 20. 5月. 1992 (20. 05. 92) &US, A, 5367110	5-14
A	WO, A, 9319190 (Du Pont de Nemours & Co E I) 30. 9月. 1993 (30. 09. 93) &AU, A, 9339233	5-14
A	J. Bacteriol 第166巻第1号 (1986)	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 01. 95

国際調査報告の発送日

14.02.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

種 村 慈 樹

4 B

9 3 5 9

電話番号 03-3581-1101 内線

3449

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	Richard Francois et al. 「Chromosomal location and nucleotide sequence of the Escherichia coli dapA gene 」p. 297-300	
PA	WO, A, 9411517 (味の素株式会社), 26. 5月. 1994 (26. 05. 94) (ファミリーなし)	5-14
X/Y	EP, A, 435132 (FORSCHUNGSZENT JUELICH GMBH), 3. 7月. 1991 (03. 07. 91) & DE, A, 3943117	1/2-14

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1992年7月)